

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/37, C07K 14/025, A61K 39/12, C12N 5/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/32861 (43) Date de publication internationale: 30 juillet 1998 (30.07.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00169 (22) Date de dépôt international: 29 janvier 1998 (29.01.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/00964 29 janvier 1997 (29.01.97) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO [MX/MX]; Instituto de Investigaciones Biomedicas, Apartado Postal 70227, Mexico, D.F. 04510 (MX). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DESAINTEs, Christian [BE/FR]; 9 A, boulevard Jourdan, F-75014 Paris (FR). DEMERET, Caroline [FR/FR]; 17, rue Capron, F-75018 Paris (FR). GOYAT, Sylvain [FR/FR]; 7, rue de Vouillé, F-75015 Paris (FR). YANIV, Moshe [FR/FR]; 159, rue Blomet, F-75015 Paris (FR). THIERRY, Françoise [FR/FR]; 56, rue Labrouste, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: COMPOSITION CONTAINING A PAPILLOMAVIRUS E2 PROTEIN OR A NUCLEOTIDE SEQUENCE CODING FOR A PAPILLOMAVIRUS E2 PROTEIN (54) Titre: COMPOSITION COMPRENANT UNE PROTEINE E2 DE PAPILLOMAVIRUS OU UNE SEQUENCE DE NUCLEOTIDES CODANT POUR UNE PROTEINE E2 DE PAPILLOMAVIRUS (57) Abstract The invention concerns a composition containing a papillomavirus E2 protein or a nucleotide sequence coding for a papillomavirus E2 protein. The invention also concerns the use of this composition as medicine. The invention further concerns the use of this composition for treating a papillomavirus infection, and particularly for treating cancer associated with a papillomavirus infection. (57) Abrégé L'invention concerne une composition comprenant une protéine E2 de papillomavirus ou une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 de papillomavirus. L'invention concerne également l'utilisation de cette composition comme médicament. L'invention concerne l'utilisation de cette composition pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPOSITION COMPRENANT UNE PROTEINE E2 DE PAPILLOMAVIRUS
OU UNE SEQUENCE DE NUCLEOTIDES CODANT POUR UNE PROTEINE E2
DE PAPILLOMAVIRUS

5 L'invention concerne une composition comprenant au moins une protéine E2, sauvage ou modifiée, de papillomavirus ou une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2, sauvage ou modifiée, de papillomavirus, et un véhicule physiologiquement acceptable. L'invention concerne également leur utilisation comme médicament, et notamment pour le traitement d'une infection à papillomavirus et également pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus.

Les papillomavirus sont des virus à ADN identifiés chez l'homme et chez l'animal, qui induisent des lésions de la peau et les muqueuses, ces lésions pouvant évoluer vers la formation de carcinomes ou cancer, notamment du col de l'utérus.

Chez l'homme, plus de 70 types de papillomavirus (HPV) ont été identifiés, un tiers infectant l'appareil génital (de Villiers, E.M. et al. (1994), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **186**, 1-12). Les papillomavirus qui infectent l'appareil génital peuvent être classés en deux catégories : les types qui sont associés à des carcinomes à haut risque tels que HPV 16, 18, 31 et 33, les types à faible risque qui sont associés à la formation de verrues banales (condylomes), tels que HPV 6, 11 et 13.

La protéine E2 de Papillomavirus joue un rôle important dans le cycle de vie du virus en régulant la transcription et la réplication du génome viral. La protéine E2 régule la transcription virale lorsqu'elle est liée à une séquence d'ADN palindromique présente en plusieurs copies dans la région de régulation de tous les papillomavirus. La protéine E2, avec la protéine E1 et les facteurs de réplication cellulaire, agit également au niveau de l'initiation de la réplication d'ADN viral (Ustav, M. et al. (1991), *EMBO J.*, **10**, 449-457; Chiang, C.M. et al. (1992), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 5799-5803; Del Vecchio, A.M. et al. (1992), *J. Virol.*, **66**, 5949-5958; Le Moal et al., 1996, *J. Virol.*, **68**, 1085-1093).

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

La protéine E2 contient deux régions relativement bien conservées chez tous les papillomavirus; ces deux régions sont séparées par une région non conservée et de longueur variable, selon les types de papillomavirus, (région appelée "chamière" , Giri, I. et al. (1988), *EMBO J.*, 10, 2931-2940). La partie amino-terminale de la protéine E2 est nécessaire pour la transactivation; la réplication et l'association avec la protéine E1 (Benson, J.D. et al. (1995), *J. Virol.*, 69, 4364-4372). La partie carboxy-terminale de la protéine E2 est responsable de la dimérisation de la protéine et de sa liaison spécifique avec l'ADN (Androphy, E.J. et al. (1987), *Nature*, 325, 70-73; Dostatni, N. et al. (1988), *EMBO J.*, 7, 3807-3816; McBride, A.A. et al. (1989), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 510-514).

Le papillomavirus bovin de type 1 (BPV-1) a été étudié de façon approfondie comme un modèle pour la réplication, la transcription et la transformation cellulaire des papillomavirus. L'expression des gènes viraux est contrôlée par sept promoteurs, quatre de ceux-ci sont activés par une protéine E2 de 48 kDa complète. BPV-1 code également pour deux formes tronquées de E2, l'une de 28 kDa et l'autre de 31 kDa (Lambert, P.F. et al. (1989), *J. Virol.*, 63, 3151-3154). La forme de 31 kDa (E2TR) est obtenue par transcription initiée en amont d'un codon ATG interne, et est dépourvue de la région de transactivation N-terminale. Cela va à l'encontre de la transcription activée par E2 par une liaison compétitive de son élément de reconnaissance et/ou par hétérodimérisation (Lambert, P.F. et al. (1987), *Cell*, 50, 69-78; Ham, J. et al. (1991b), *Trends Biochem. Sci.*, 16, 440-444).

Au stade actuel des traitements des carcinomes génitaux dus à une infection par un papillomavirus, seule la chirurgie classique ou par laser présente une certaine efficacité si la maladie est détectée assez tôt. Cependant, le taux de mortalité reste particulièrement élevé, surtout dans les pays ne pratiquant pas un dépistage systématique et régulier. Le cancer du col de l'utérus, provoqué par une infection à papillomavirus, est presque aussi fréquent que le cancer du sein chez la femme.

Il est donc apparu nécessaire de rechercher des voies d traitement alternatives ou complémentaires, pouvant notamment inclure des protocoles de traitement locaux et le cas échéant systématiques, non chirurgicaux.

Dans ce cadre, le transfert du gène p53 sauvage à des tumeurs
5 cancéreuses a été proposé par Roth et al., *Nature Medicine*, 1996, 2 (9), 985-991. L'injection d'un vecteur rétroviral contenant le gène sauvage p53 a permis d'observer une régression de la tumeur cancéreuse chez trois patients et une stabilisation de la croissance de la tumeur chez trois autres patients. Une telle
10 thérapie par transfert du gène p53 n'est pas envisageable dans le cas de cellules infectées par un papillomavirus, car la protéine p53 est inactivée dans ce type de cellules.

Une autre approche, choisie dans le cadre de l'invention, a consisté à définir des moyens capables de freiner le développement viral de papillomavirus et/ou susceptibles d'empêcher la formation ou l'évolution des lésions cellulaires
15 causées par l'infection et notamment d'arrêter la prolifération cellulaire des tumeurs cancéreuses ou de tuer les cellules de ces tumeurs.

A cet effet, la présente invention concerne une composition comprenant une protéine E2, sauvage ou modifiée, de papillomavirus ou une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2, sauvage ou modifiée, de
20 papillomavirus, et un véhicule physiologiquement acceptable.

Une telle composition est susceptible d'avoir des effets in vitro et/ou in vivo sur des cellules infectées par papillomavirus.

Par séquence de nucléotides, on entend un polynucléotide; et notamment un ADN, en particulier un ADNc, un ARN, un fragment d'acide nucléique ou une
25 séquence synthétique. De préférence, on entend un ADN.

La protéine E2 de papillomavirus a été décrite pour les différents types d'isolats viraux identifiés, dans plusieurs publications.

La séquence de l'ADN E2 du génome viral isolé d'un carcinome du col de l'utérus provoqué par une infection par un papillomavirus humain de type 18
30 (HPV18) a été décrite par Cole et al., *J. Mol. Biol.*, 1987, 193, 599-608.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

La séquence de l'ADN de la protéine E2 d'un papillomavirus humain de type 16 (HPV16) a été décrite par Seedorf et al., *Virology*, 1985, 145, 181-185; Kennedy et al., *J. Virol.*, 1991, 65, 2093-2097.

La séquence de l'ADN de la protéine E2 d'un papillomavirus humain de type 31 (HPV31) a été décrite par Goldsborough et al., *Virology.*, 1989, 171, 306-311.

La séquence de l'ADN de la protéine E2 d'un papillomavirus humain de type 33 (HPV33) a été décrite par Cole et al., *J. Virol.*, 1986, 58, 991-995.

La séquence de l'ADN de la protéine E2 d'un papillomavirus bovin de 1 (BPV-1) a été décrite par Chen et al., *Nature*, 1982, 299, 529-534 et par Danos et al., *J. Virology*, 1983, 46, 557-566.

Les séquences de nucléotides, et notamment de l'ADN, codant pour la protéine E2 d'autres papillomavirus ont été publiées et sont notamment accessibles via les références de la banque de données GENBANK.

Selon l'invention, on met habituellement en oeuvre une protéine ou une séquence de nucléotides isolée; de préférence, au moins partiellement purifiée; et, de manière particulièrement préférée, pure.

De façon préférée, la composition selon l'invention est dépourvue de la protéine E1 de papillomavirus.

Par véhicule physiologiquement acceptable, on entend toute substance ou composition compatible avec l'administration in vivo.

La composition selon l'invention comprend avantageusement une protéine E2 qui est une protéine dont la séquence d'acides aminés est modifiée par rapport à celle de la protéine E2 sauvage, ou une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2, séquence qui est modifiée par rapport à la séquence sauvage, de telle sorte que la protéine E2 résultante a substantiellement l'activité biologique de la protéine E2 sauvage sur la protéine cellulaire p53.

Par protéine sauvage, on entend une protéine naturelle, retrouvée dans les isolats cliniques viraux, isolée de son environnement naturel dans le

papillomavirus, c'est-à-dire identifié, isolée et purifiée à partir d'un papillomavirus. C'est une protéine qui est codée par un gène de papillomavirus.

Par protéine modifiée, on entend une protéine dont la séquence d'acides aminés est différente de la séquence de la protéine sauvage par au moins un
5 acide aminé, notamment après mutation. La séquence modifiée vise à rendre la synthèse de la protéine plus efficace et à conférer à la protéine une stabilité intracellulaire accrue. Généralement, elle est différente par 1 à 20 acides aminés, habituellement par 1 à 15 acides aminés, de préférence par 1 à 10 acides aminés et de manière particulièrement préférée par 1 à 5 acides aminés.
10 L'invention vise par exemple une protéine E2 ayant subi une mutation ponctuelle par substitution d'un acide aminé.

Par séquence de nucléotides modifiée, on entend une séquence de nucléotides différente de la séquence de nucléotides qui code pour la protéine sauvage par au moins un nucléotide. Généralement, elle est différente par 1 à 60
15 nucléotides, habituellement par 1 à 30 nucléotides, de préférence par 1 à 20 nucléotides et de manière particulièrement préférée par 1 à 6 nucléotides. En particulier, l'invention se rapporte à une séquence de nucléotides différente par un codon de la séquence sauvage codant pour la protéine E2.

La séquence peut être modifiée par voie chimique ou par une technique
20 de génie génétique (séquence mutée). Des procédés de modification de séquences sont connus.

La séquence modifiée de la protéine E2 ou de la séquence de nucléotides, notamment l'ADN, codant pour la protéine E2 peut être modifiée en étant tronquée à son extrémité N- et/ou C-terminale, ou tronquée dans sa partie
25 interne, ou en partie substituée. Dans ces conditions, il conviendra de vérifier, par exemple sur la base des tests proposés dans la partie expérimentale qui suit, que la forme modifiée est active pour les propriétés recherchées vis-à-vis d'une infection à papillomavirus.

La protéine cellulaire p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 53 kDa.
30 Elle a été décrite dans Pathologie Biologie, Mars 1995, Vol. 43 (3), 166-173; et par Linda J. Ko et al., Genes & Development, 1996, 10, 1054-1072. La protéine

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

p53 est un facteur de transcription qui lie des séquences d'ADN spécifiquement (Farmer et al; Nature, 1992, 358, 83-86; Funk et al., Mol. Cell Biol., 1992, 12, 2866-2871 et Kastan et al., Cell, 1992, 71, 587-597).

Par protéine résultante, on entend la protéine obtenue après la
5 modification de la séquence d'acides aminés ou de la séquence de nucléotides qui code pour la protéine.

L'invention concerne également une composition comprenant une protéine E2 dont la séquence est modifiée par rapport à celle de la protéine E2 sauvage, ou une séquence de nucléotides modifiée par rapport à la séquence sauvage, de
10 telle sorte que la protéine E2 résultante participe à une activité biologique d'apoptose de cellules infectées par un virus de type papillomavirus.

Par apoptose, on entend mort des cellules infectées par le virus ou des cellules dérivées ou descendantes de ces dernières.

L'invention concerne également une composition comprenant une protéine
15 E2 modifiée dont la séquence est modifiée dans la région régulant la réplication virale, de telle sorte que la protéine E2 résultante est déficiente pour la réplication virale de papillomavirus.

L'invention concerne également une composition comprenant une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 modifiée, dont la
20 séquence est modifiée dans la région responsable de la réplication virale, de telle sorte que la protéine E2 résultante est déficiente pour la réplication virale de papillomavirus.

Une procédure pour mettre en évidence une telle protéine déficiente pour la réplication virale a notamment été décrite par Demeret et al., *Nucleic Acids*
25 *Research*, 1995, 23 (23), 4777-4784. Pour que la protéine E2 soit déficiente pour la réplication virale, la séquence est, de préférence, modifiée, notamment mutée par délétion, substitution, addition, dans la région N-terminale de la protéine E2. De telles protéines, sont notamment décrites par Sakai et al., *J. Virology*, 1996, 70 (3), 1602-1611, par Brokaw et al., *J. Virology*, 1996, 70 (1), 23-29, et par
30 Ferguson et al., *J. Virology*, 1996, 70 (7), 4193-4199; le procédé d'obtention de telles protéines y est également décrit. La protéine E39A a donné de bons

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

résultats, le résidu situé à la position 39 dans la séquence de la protéine sauvage est substitué par une alanine dans la séquence modifiée.

La présente invention s'applique aux protéines E2 et aux séquences de nucléotides codant pour une protéine E2 de tous les papillomavirus. Habituellement, elle s'applique aux papillomavirus humains. De préférence, elle s'applique à un papillomavirus du groupe comprenant HPV16, HPV18, HPV31 et HPV33. Elle s'applique également aux papillomavirus bovins. De préférence, elle s'applique à un papillomavirus bovin BPV-1.

La présente invention concerne par ailleurs une séquence de nucléotides codant pour une protéine dérivée de la protéine E2 de papillomavirus HPV18, le résidu situé à la position 2 dans la séquence de la protéine dérivée de E2 étant un résidu acide glutamique. Cette séquence de nucléotides résulte du fait que le codon qui suit le codon ATG d'initiation de la traduction de la protéine E2 a été modifié au cours du clonage par insertion d'un site de restriction NCOI. En d'autres termes, dans la séquence de nucléotides ATGCAG le C a été remplacé par un G.

La séquence de la protéine E2 est particulièrement bien conservée dans tous les types de papillomavirus. L'alignement des séquences des protéines E2 de divers papillomavirus est illustré dans la figure 13. Le domaine d'interaction à l'ADN de la protéine E2 de divers papillomavirus contient deux hélices α dont la plus grande est située entre les résidus d'acides aminés aux positions 288 à 305 de la séquence du papillomavirus humain HPV18. La séquence de cette hélice α est presque totalement conservée chez tous les papillomavirus humains et bovins. Différents résidus sont conservés dans les séquences des protéines E2 de la plupart des papillomavirus; par exemple la séquence de la protéine E2 du papillomavirus bovin BPV-1 comprend un résidu arginine à la position 344 qui correspond selon l'alignement des séquences à la position 305 dans la séquence de la protéine E2 du papillomavirus humain HPV18. L'invention concerne à cet égard une protéine E2 modifiée ou une séquence de nucléotides qui code pour une protéine E2 modifiée dans la zone de l'hélice α telle que définie ci-dessus.

La présente invention concerne également une séquence de nucléotides codant pour une protéine dérivée d'une protéine E2 de papillomavirus humain, ladite protéine comprenant une séquence d'acides aminés dont au moins un résidu choisi parmi les suivants est modifié par exemple par substitution:

- 5 - le résidu proline en position 288,
- le résidu glycine en position 294,
- le résidu asparagine en position 297,
- le résidu lysine en position 300,
- le résidu cystéine en position 301,
- 10 - le résidu leucine en position 302,
- le résidu arginine en position 305.

La mutation peut être une substitution par un résidu tel que un résidu alanine ou leucine.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence modifiée de la protéine E2 ou de la séquence de nucléotides, notamment l'ADN, codant pour la protéine E2 modifiée est tronquée à son extrémité N- et/ou C-terminale, ou tronquée dans sa partie interne, ou en partie substituée. Dans ces conditions, il conviendra de vérifier, par exemple sur la base des tests proposés dans la partie expérimentale qui suit, que la forme modifiée est active pour les propriétés recherchées vis-à-vis d'une infection à papillomavirus ou d'une transformation cellulaire associée à un papillomavirus. D'une manière générale, les protéines utilisées dans la présente invention conservent avantageusement la capacité de liaison à l'ADN de la protéine E2 sauvage.

L'invention concerne aussi un vecteur comprenant une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus. Habituellement ce vecteur est choisi parmi le groupe des vecteurs formé par les plasmides, virus, rétrovirus, ou les vecteurs synthétiques ou les vecteurs inertes. De préférence, le vecteur est un virus, tel que un adénovirus, un parvovirus ou un AAV notamment. De manière particulièrement préféré, ce vecteur est un adénovirus.

Un vecteur de type adénovirus pouvant être utilisé pour réaliser l'invention est notamment décrit par Qing Wang et al. (*Nature Medicine*, 1996, 2 (6), 714-

716). Le choix du vecteur tiendra compte des objectifs recherchés, selon par exemple qu'il s'agit de définir des moyens de traitement, par exemple par thérapie génique de l'infection par un papillomavirus chez un hôte ou d'une transformation maligne chez un hôte.

- 5 Un exemple de construction d'un vecteur recombinant, d'origine virale, est notamment décrit dans la demande de brevet internationale WO 93/06223.

Le vecteur de l'invention est avantageusement choisi parmi les vecteurs ayant un titre infectieux élevé et présentant les garanties de sécurité appropriées pour le cas échéant l'administration in vivo chez un patient infecté par un
10 papillomavirus.

Par vecteur synthétique, on entend tout système de transfert de gène non-viral. Par exemples, un vecteur synthétique peut comprendre un ADN nu, un liposome, un complexe ADN-protéine, un complexe ADN-polymère cationique. D'autres exemples sont décrits par Yang (*Critical rev. Biotech.*, 1992, 12, 335-
15 356).

D'autres vecteurs utilisables dans le cadre de l'invention sont les vecteurs inertes comme par exemple les liposomes (FR 9402070).

L'invention concerne également le plasmide pCGE2.18VoNCO déposé à la C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut
20 Pasteur, 25, Rue de Docteur Roux, Paris, France) le 29 janvier 1997 sous le numéro I-1839.

L'invention concerne également le plasmide pCGE2TR déposé à la C.N.C.M. le 29 janvier 1997 sous le numéro I-1838.

L'invention concerne également une protéine dérivée de la protéine E2 de
25 papillomavirus HPV18, ladite protéine comprenant une séquence d'acides aminés dont au moins le résidu situé à la position 2 est un résidu acide glutamique.

L'invention concerne une protéine E2 de papillomavirus, qui comprend une séquence d'acides aminés dont au moins un résidu choisi parmi les suivants
30 est modifiée par exemple par substitution:

- le résidu proline en position 288,

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

- le résidu glycine en position 294,
- le résidu asparagine en position 297,
- le résidu lysine en position 300,
- le résidu cystéine en position 301,
- 5 - le résidu leucine en position 302,
- le résidu arginine en position 305.

L'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant une séquence de nucléotides ou un vecteur tels que définis ci-dessus et un véhicule physiologiquement acceptable. L'invention concerne également une composition
10 pharmaceutique comprenant une protéine, telle que définie ci-dessus, et par exemple E2TR et un véhicule physiologiquement acceptable.

La protéine E2TR est une forme de protéine E2 de BPV-1. Elle ne contient pas la majeure partie du domaine de transactivation N-terminale. Elle a un poids moléculaire de 31 kDa (Lambert et al., Cell, 1989, 50, 69-78).

15 Le terme "composition pharmaceutique" désigne toute composition compatible avec un usage dans le domaine de la pharmacie, qu'il s'agisse d'un usage thérapeutique curatif ou prophylactique, ou d'un usage en traitement de maintien ou complémentaire d'un traitement thérapeutique. Plus généralement, il s'agit d'une composition compatible avec un usage chez l'homme.

20 Ainsi, les moyens de l'invention définis dans les pages précédentes, à savoir les séquences de nucléotides codant pour une protéine E2 ou pour une protéine E2 modifiée, les vecteurs les contenant, les protéines E2 ou protéines E2 modifiées sont les principes actifs d'une composition susceptible de constituer un médicament ou d'entrer dans la composition d'un médicament.

25 Dans le cadre de l'invention, la composition définie ci-dessus ainsi que les séquences de nucléotides codant pour une protéine E2 ou pour une protéine E2 modifiée, les vecteurs les contenant, les protéines E2 ou protéines E2 modifiées sont utilisables pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus ou à une
30 transformation cellulaire associée à un papillomavirus.

Avantageusement, l'invention concerne également le plasmide pCGE2.18VoNCO déposé à la C.N.C.M.(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, Rue d Docteur Roux, Paris, France) le 29 janvier 1997 sous le numéro I-1839 pour l'utilisation comme médicament. En particulier, il s'applique pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus ou à une transformation cellulaire associée à un papillomavirus.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne également le plasmide pCGE2TR déposé à la C.N.C.M. le 29 janvier 1997 sous le numéro I-1838 pour l'utilisation comme médicament. En particulier, il s'applique pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus ou à une transformation cellulaire associée à un papillomavirus.

L'invention concerne également une utilisation d'une composition selon l'invention ainsi que les séquences de nucléotides codant pour une protéine E2 ou pour une protéine E2 modifiée, les vecteurs les contenant, les protéines E2 ou protéines E2 modifiées pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation thérapeutique contre une infection à papillomavirus, et notamment contre un cancer associé à une infection à papillomavirus ou à une transformation cellulaire associée à un papillomavirus.

L'invention concerne en particulier l'utilisation d'un vecteur contenant une séquence de nucléotides codant pour la protéine E2 de papillomavirus modifiée ou sauvage, ou d'un vecteur tel que défini ci-dessus, ou du plasmide pCGE2.18VoNCO, ou du plasmide pCGE2TR pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation thérapeutique contre une infection à papillomavirus, et notamment contre un cancer associé à une infection à papillomavirus.

Selon la présente demande, l'expression "traitement d'une infection due à un papillomavirus" s'applique aux activités biologiques développées in vitro ou in vivo au niveau des cellules infectées par un papillomavirus ou des cellules dérivées de ces dernières, notamment par prolifération, activités résultant directement ou indirectement de la mise en contact d sdites cellules avec les

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

compositions, séquences de nucléotides ou protéines décrites ci-dessus. Ces activités comprennent les effets observés sur le virus, en particulier sur la réplication virale, après mise en contact des cellules avec les moyens de l'invention, ainsi que les effets observés sur le métabolisme ou la croissance des
5 cellules infectées ou des cellules dérivées de ces dernières, notamment par prolifération.

Le traitement de l'infection inclut la thérapie, incluant le contrôle de l'évolution de l'infection y compris la prévention ou l'inhibition chez un hôte infecté, du développement de lésions ou de tumeurs liées à l'infection t
10 susceptibles de progresser vers la phase clinique du cancer (stade de l'infection succédant à la phase asymptomatique chez le patient) ou vers le développement de métastases ou le stade fatal de la maladie. Avantageusement, cette expression englobe la capacité de faire diminuer la charge virale chez l'hôte y compris jusqu'à l'élimination ou la mise en latence du virus chez le patient infecté
15 et/ou de préférence cette expression englobe l'arrêt de la croissance des lésions ou des tumeurs développées à la suite de l'infection par papillomavirus.

De façon préférée, l'invention a pour objet l'utilisation des moyens décrits ci-dessus, pour provoquer l'apoptose des cellules infectées par des papillomavirus ou des cellules dérivées de ces dernières, notamment par
20 prolifération, en particulier des cellules cancéreuses.

Le traitement de l'infection par papillomavirus concerne donc dans le cadre ci-dessus défini, le traitement de la cause de l'infection ou des effets observés ou latents chez un patient infecté par un papillomavirus, que ces effets soient liés à la réplication virale dans différents types cellulaires au cours du
25 développement de l'infection et en particulier dans les cellules cibles du papillomavirus au niveau du col de l'utérus ou le cas échéant dans les cellules participant à l'immunité de l'hôte, ou qu'il s'agisse des effets observés chez l patient corrélativement à l'évolution de l'infection, tels que le développement des lésions et tumeurs précancéreuses ou cancéreuses.

30 L'invention a également pour objet une cellule procaryote ou eucaryote recombinée, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides

telle que décrite précédemment ou un vecteur selon l'invention, dans des conditions permettant l'expression *in vitro* ou *in vivo* de ladite séquence.

Des cellules eucaryotes intéressantes sont des cellules humaines ou animales.

- 5 Entrent dans le cadre de l'invention des cellules recombinantes contenant une séquence d'ADN codant pour une protéine E2 ou pour une protéine E2 modifiée selon l'invention, cette séquence étant placée sous le contrôle d'un promoteur d'expression.

- Les cellules recombinantes peuvent être des lignées transitoires ou
10 permanentes, par exemple des lignées HeLa.

Elles peuvent être également utilisées pour tester voire quantifier les effets de molécules choisies notamment de molécules dérivées des protéines E2 ou des ADN codant pour une protéine E2, dans des cellules infectées par un papillomavirus.

- 15 Entre également dans le cadre de l'invention une composition à usage thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un principe actif choisi parmi une protéine E2 de papillomavirus ou une protéine modifiée selon l'invention ou un ADN codant pour une protéine E2 de papillomavirus ou codant pour une protéine modifiée selon l'invention, un vecteur selon l'invention, ou encore une
20 cellule recombinante telle que définie précédemment. Le cas échéant, cette composition à usage thérapeutique peut présenter en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié, notamment un véhicule aqueux ou un véhicule sous forme de liposomes.

- La formulation de la composition peut varier selon que l'on recherche chez
25 le patient un effet transitoire ou un effet retard du principe actif.

- La protéine E2 ou la protéine E2 modifiée selon l'invention ou l'ADN qui code pour la protéine E2 ou pour une protéine E2 modifiée selon l'invention, ainsi que les compositions, vecteurs et/ou cellules les comprenant peuvent être utilisés seuls ou en association ou en combinaison, pour l'administration séparée
30 ou simultanée avec d'autres molécules actives pour le traitement de l'infection par un papillomavirus. A titre d'exemple, un agent actif dans le traitement d'une

infection due à un papillomavirus choisi parmi les composés ayant une activité d'inhibiteur ou de régulateur de cycle cellulaire viral, ou un composé actif en immunothérapie, peut être associé aux réactifs de l'invention.

5 Selon l'invention, l'expression transitoire de la protéine E2 de papillomavirus humain ou bovin, ou d'une protéine E2 dont la séquence a été modifiée, dans des cellules tumorales infectées par un papillomavirus induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et/ou conduit à l'apoptose cellulaire.

10 L'arrêt du cycle cellulaire par la protéine est dû à une activation post-transcriptionnelle de la protéine p53, soit par régulation négative de l'expression du gène E6, qui est connu pour réguler négativement la stabilité de la protéine p53, soit par une voie indépendante de l'expression du gène E6.

La présente invention a montré l'effet inducteur de l'apoptose de la protéine E2 d'un papillomavirus, ou d'une protéine E2 dont la séquence a été modifiée.

15 La présente invention concerne l'utilisation de la protéine E2 en tant que composé antitumoral dans le cas d'infections par des papillomavirus conduisant à un développement de cancer.

20 La présente invention a également montré l'action synergique de la protéine E2TR et de la protéine E2K344 dans l'activation post-transcriptionnelle du gène p53. L'invention a montré que la protéine E2K344 est capable d'induire une apoptose dans les cellules tumorales infectées par un papillomavirus.

Les approches de thérapie génique du cancer peuvent être réalisées selon deux axes : dans le contexte de la phase tumorale d'une tumeur solide ou dans le contexte postchirurgical micrométastatique.

25 Un effet de proximité ("by-stander") a été observé, c'est à dire que les cellules tumorales n'ayant pas fait l'objet d'un traitement ont été détruites par effet de continuité.

30 La présente invention montre que l'injection d'un plasmide contenant le gène E2 sous contrôle du promoteur CMV provoque une diminution des tumeurs de cellules HeLa greffées chez la souris nude. Cela démontre l'activité anti-

tumorale in vivo de l'expression du gène E2 dans des cellules tumorales initialement infectées par un papillomavirus.

La composition, la protéine; le vecteur, la séquence de nucléotides, telle que l'ADN contenant le gène E2, selon l'invention peuvent être injectés au malade après avoir été couplés à des composés qui favorisent la pénétration de ceux-ci, notamment de l'ADN à l'intérieur de la cellule ou son transport jusqu'au noyau cellulaire. Les conjugués résultants peuvent être encapsulés dans des microparticules de polymères, comme décrit dans la demande de brevet internationale WO 94/27238.

La séquence de nucléotides selon l'invention peut être complexée avec du DEAE-dextran (comme cela est décrit par Pagano et al., J. Virol., 1967, 1, 891), ou avec des protéines nucléaires (comme cela est décrit par Kaneda et al., Science, 1989, 243, 375), avec des lipides (comme cela est décrit par Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1987, 84, 7413), ou encapsulées dans des liposomes (comme cela est décrit par Fralkey et al. J. Biol. Chem., 1980, 255, 10431).

La séquence de nucléotides selon l'invention, telle que l'ADN qui code pour la protéine E2, peut être introduite sous la forme d'un gel facilitant sa transfection dans les cellules. Une telle composition sous forme de gel peut être un complexe de poly-L-lysine et de lactose, comme décrit par Midoux et al. (Nucleic Acids Research, 1993, 21, 871-878), ou avec un polymère de marque POLOXAMER 407, comme décrit par Pastore (Circulation, 1994, 90, 1, 517).

La séquence de nucléotides selon l'invention peut également être en suspension dans une solution tampon pour être appliquée au patient.

La séquence de nucléotides selon l'invention, telle que l'ADN qui code pour la protéine E2, peut également être associée à des liposomes. Par exemple, avec les liposomes, l'ADN peut être encapsulé dans une bicouche lipidique, comme décrit dans la demande de brevet internationale WO 95/22961.

Une autre technique d'application comprend un bombardement des cellules tumorales avec des microbilles recouvertes d'ADN (procédé de biolistique).

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Il est également possible d'utiliser l'ADN avec un agent complexant d'ADN, t l que les polymères cationiques t les lipides cationiqu s. Les polymères cationiqu s pouvant être utilisés sont notamment la polylysine, la protamine, et la spermine. L s lipides pouvant être utilisés sont notamment l DOTMA 1,2-
5 dioléxyloxypropyl-3-triméthyl bromide d'ammonium. Certains lipides polycationiques peuvent également être utilisés.

La présente invention concerne également un mélange contenant la protéine E2, une protéine E2 dont la séquence a été modifiée, la séquence de nucléotides qui code pour la protéine E2 ou pour une protéine E2 dont la
10 séquence a été modifiée, et un additif qui favorise leur effet.

Par additif qui favorise leur effet, on entend un inhibiteur ou un régulateur de cycle cellulaire, un agent qui favorise l'augmentation de la synthèse de la protéine p53 induite, une substance chimiothérapeutique, telle que notamment le taxol, le cisplatine.

15 La protéine E2 ou la séquence de nucléotides codant pour la protéine E2 ou la composition selon l'invention peuvent être délivrées directement dans l'espace interstitiel des tissus infectés ou à l'intérieur des cellules infectées par un papillomavirus et/ou des cellules portant des lésions pré-cancéreuses et/ou des cellules cancéreuses. Une telle méthode appliquée à un ADN nu est notamment
20 décrite dans la demande de brevet internationale WO 90/11092.

La présente invention concerne également une formulation locale ou topique comprenant une protéine E2 sauvage ou modifiée ou une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 sauvage ou modifiée, une composition telle que décrite ci-dessus ou un vecteur tel que décrit ci-dessus.

25 La protéine E2 sauvage ou modifiée, ou la séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 peuvent être mise en oeuvre à diverses doses selon l'étendue de la surface à traiter et l'importance des lésions associées à l'infection. On met en oeuvre une composition contenant une dose qui comprend habituellement de 1 à 1000 µg de séquence de nucléotides, et de préférence de
30 10 à 500 µg de séquence de nucléotides. On met en oeuvre une composition contenant une dose qui comprend habituell ment de 0,05 à 10 µg de protéine, t

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

d préférence de 0,1 à 1 μ g d protéine. Avantageusement, le traitement est local, la composition étant directement appliquée au niveau de la lésion, soit une seule fois, soit plusieurs fois à intervalles réguliers de plusieurs jours, par exemple 5 à 10 jours.

- 5 Habituellement, lorsque la composition comprend une protéine E2, la composition comprend, de plus, un agent complexant qui facilite l'internalisation de la protéine dans les cellules infectées.

La présente invention concerne également un procédé permettant de sélectionner des dérivés de la protéine E2 capables d'induire l'apoptose de
10 cellules infectées par un virus de type papillomavirus. Un tel procédé comprendra avantageusement la mise en oeuvre d'une cellule hôte en culture contenant la partie du génome d'un papillomavirus humain ou bovin correspondant aux gènes E6 et E7, cette partie du génome comprenant également la région promotrice P105, placée en amont des séquences codant pour les gènes E6 et E7. La
15 partie du génome de papillomavirus contenu dans la cellule hôte en culture sera indifféremment intégrée dans le génome de ladite cellule hôte ou sous la forme d'un vecteur contenant ladite partie du génome d'un papillomavirus. Avantageusement la partie du génome d'un papillomavirus contenant les gènes E6 et E7, ainsi que leur région promotrice sera intégrée dans le génome de ladite
20 cellule hôte eucaryote, qui sera de préférence une cellule de mammifère et de façon encore plus préférée une cellule humaine, avantageusement une cellule humaine immortalisée.

La cellule hôte mise en oeuvre dans le procédé de sélection de dérivés de E2 biologiquement actifs selon l'invention est transfectée avec un vecteur, en
25 particulier un adénovirus recombinant ou un plasmide, contenant une séquence nucléique codant pour un candidat dérivé de la protéine E2 à tester placée sous le contrôle d'éléments permettant son expression dans la cellule hôte.

L'activité des dérivés de la protéine E2 selon l'invention est ensuite évaluée en mettant en oeuvre le test d'apoptose décrit à l'exemple 12 ou à
30 l'exemple 13, par exemple en mesurant le degré de mortalité dans la culture de cellules hôtes transfectées.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Dans un mode de réalisation particulier du procédé de criblage de l'invention, les cellules hôtes contenant la partie du génome d'un papillomavirus comprenant E6 et E7 et P105 sont cotransfectées respectivement par un premier vecteur (plasmide par exemple) contenant un gène marqueur exprimable dans lesdites cellules hôtes et un second vecteur contenant une séquence nucléique codant pour un candidat dérivé de la protéine E2 à tester placée sous le contrôle d'éléments permettant son expression dans cette cellule hôte. Le gène marqueur est avantageusement un gène codant pour une protéine facilement détectée dans la culture cellulaire, avantageusement une protéine fluorescente, et plus particulièrement une protéine GFP.

L'évolution de la mortalité cellulaire est alors suivie par l'observation de la fluorescence de la culture des cellules hôtes transférées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

La présente invention a montré que l'inactivation de la protéine E2 virale joue un rôle essentiel dans le développement du cancer du col de l'utérus. La progression de la dysplasie associée au papillomavirus HPV18 vers un stade malin est en relation avec la rupture de la phase ouverte de lecture de E2 ou de son défaut d'expression qui est une conséquence de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Berumen, J. et al., 1994, *Int. J. Cancer*, 56, 640-645).

Un tel cas a eu lieu dans les cellules HeLa venant d'un carcinome du col de l'utérus due à un papillomavirus humain HPV18 (Schwarz, E. et al., 1985, *Nature*, 314, 111-114).

Le phénotype transformé est dépendant de l'expression continue des protéines E6 et E7 virales (Bosch, F.X. et al., 1990, *J. Virol.*, 64, 4743-4754). Ces gènes ont été transcrits à partir du promoteur p105 qui contient les sites de liaison pour la protéine E2 (Thierry, F. et al., 1987b, *J. Virol.*, 61, 134-142). Il a été montré dans des essais de co-transfection que E2 réprime le promoteur P₁₀₅ en liant spécifiquement ses séquences d'ADN situées près de la boîte TATA (Thierry, F. et al., 1991, *New Biol.*, 3, 90-100; et Demeret, C. et al., 1994, *J. Virol.*, 68, 7075-7082).

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Dans la présente invention, il a été montré que la réintroduction de la protéine E2 de HPV18 et BPV-1 dans des cellules HeLa a réprimé la transcription des gènes E6/E7 endogènes, dont les produits inactivent les gènes de suppression tumorale cellulaires p53 et Rb, respectivement (Dyson, N. et al., 1989, *Science*, 243, 934-937; Scheffner, M. et al., 1990, *Cell*, 63, 1129-1136).

Il a été montré que la protéine E2 de BPV-1 est capable d'augmenter le taux de la protéine p53 dans les cellules HeLa de 8 à 20 fois (Hwang, E.-S. et al., 1993, *J. Virol.*, 67, 3720-3729 et 1996, *Oncogene*, 12, 795-803; et Dowhanick, J.J. et al., 1995, *J. Virol.*, 69, 7791-7799). Il a été supposé que cette augmentation du taux de p53 provoquée par E2 pourrait être due à une régulation inverse de l'expression de E6 au travers d'une répression transcriptionnelle du promoteur P₁₀₅. Cependant, les résultats de la présente invention ont montré que la régulation inverse de la transcription de E6 n'était pas le seul mécanisme cellulaire conduisant à l'activation post-transcriptionnelle pour activer p53, puisque E2TR (forme modifiée de E2 qui est dénuée de la majeure partie de la région d'activation) ne provoque pas l'augmentation du taux de la protéine p53 dans les conditions sous lesquelles elle réprime la transcription de E6/E7 endogène.

La présente invention a montré que les protéines E2 de HPV18 et BPV-1 exprimées dans les cellules HeLa peuvent activer les deux plasmides reporteurs (PG13-CAT et MDM2-CAT) portant les sites d'interaction de la protéine p53. Au contraire, les versions tronquées de E2 (protéines modifiées) ont induit de façon modérée l'activation de l'activité de transcription de p53 (moins de 10 % de celle obtenue avec la protéine E2 complète). Ces essais ont montré un écart clair entre les capacités des deux formes de E2 pour activer p53, alors que les deux ont réprimé la transcription de E6/E7 endogène. Cependant, des variations fines dans les taux de répression de la transcription de E6 pourraient exister entre les protéines de E2 complète et modifiée. Les cellules exprimant E2TR pourraient continuer à produire assez de protéine E6 pour dégrader p53.

L'existence d'une voie alternative d'activation de p53 indépendante de la répression de E6 a été confirmée par la capacité de la protéine E2K344 à induire

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

l'activité de p53, bien qu'elle soit déficiente pour la liaison de l'ADN, la répression de la transcription de HPV et l'activation des plasmides reporteurs portant les sites d'interaction de la protéine E2. Ces observations indiquent que E2 active p53 indépendamment de la répression de la transcription de E6. L'activation induite par E2 de l'activité de transcription de p53 apparaît être dirigée par deux voies indépendantes qui coopèrent. La co-expression de E2TR et E2K344 a entraîné un niveau d'activation proche de celui observé avec la protéine complète E2.

Les essais de la présente invention ont montré que l'activation de la transcription induite par E2 et l'activation de p53 sont des événements indépendants.

D'une part, E2 pourrait interagir avec p53, conduisant à la stabilisation de la protéine. Un facteur auxiliaire serait alors en jeu. D'autre part, E2 pourrait interférer avec des facteurs qui augmentent l'activité de liaison de l'ADN de p53, telle que la caséine kinase II (Hupp, T.R. et al., 1992, *Cell*, 71, 875-886), la protéine kinase C (Hupp, T.R. et al., 1994, *Curr. Biol.*, 4, 865-875); Takenaka, I. et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 5405-5411) ou les kinases cyclines dépendantes (Wang, Y. et al., 1995, *Nature*, 376, 88-91). Alternativement, E2 pourrait interagir avec un facteur qui inhibe l'activité de transcription de p53, par exemple MDM2 (Momand, J. et al., 1992, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 1998-2002).

Si E2 active p53 indépendamment de la répression de la transcription de E6, E2 devrait activer l'activité de transcription de p53 dans des lignées cellulaires HPV-négatives. En fait, il a été observé que E2 a induit une activation modérée mais régulière du plasmide reporteur PG13-CAT dans des cellules HPV-négatives contenant p53 de type sauvage, telles que HepG2 ou NIH3T3. Dans les cellules SAOS p53-null ou les cellules contenant des mutations ponctuelles dans le gène de p53 (SW13, C33 ou HaCaT), E2 était capable d'augmenter l'activation de PG13-CAT quand elle était co-exprimée avec la protéine p53 exogène. Cependant, le niveau de l'activation induite par E2 dans les cellules HPV-négatives est resté 10 fois plus faible que celui obtenu dans les

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

cellules HeLa. Ces observations montrent qu' l'activation de p53 pourrait être amplifiée dans les cellules exprimant les protéines virales.

Des essais ont montré que E2 n'a pas protégé p53 de la dégradation induite par E6 in vitro. L'expression d'un mutant dominant-négatif de E6 dans les
5 cellules HeLa n'a pas interféré avec l'activation de p53 induite par E2; ceci montre que E2 et E6 n' interagissent pas in vivo.

La protéine E2 de BPV-1 induit l'arrêt de croissance en phase G1 dans les cellules HeLa, par une augmentation du niveau de p53 (Hwang, E.-S. et al., 1993, *J. Virol.*, 67, 795-803; Dowhanick, J.J. et al., 1995, *J. Virol.*, 69, 7791-
10 7799). La présente invention a confirmé ces observations pour la protéine E2 d BPV-1 et a montré que la protéine E2 de HPV18 homologue se comportait de façon similaire.

La présente invention a montré que l'expression de c-p53 (mutant transdominant négatif) a surmonté le blocage du cycle cellulaire induite par E2,
15 prouvant de façon claire que la fonction de transactivation spécifique de séquence de p53 était responsable de cet effet.

La présente invention a montré que les protéines E2 de BPV-1 et de HPV18 provoquent la mort cellulaire quand elles sont exprimées de façon transitoire dans les cellules HeLa. La mort cellulaire induite par E2 montre les
20 caractéristiques de l'apoptose, telles que la condensation de la chromatine, le contenu de l'ADN inférieur à 2n et les coupures de l'ADN double-brin. La procédure conduisant à la mort cellulaire induite par E2 semble diverger, au moins partiellement, de celle impliquée dans l'arrêt de la croissance en phase G1 induit par E2, puisque cela n'exige pas l'activité de transcription de p53.
25 Cependant, le rôle de p53 comme régulateur de transcription ne peut pas être totalement écarté.

Les résultats obtenus confirment que l'apoptose induite par p53 est indépendante de l'activité de transcription de p53 (Caelles, C. et al., 1994, *Nature*, 370, 220-223; Wagner, A.J. et al., 1994, *Genes Dev.*, 8, 2817-2830;
30 Haupt, Y. et al., 1995, *Genes Dev.*, 9, 2170-2183 et 1996, *EMBO J.*, 15, 1596-1606; Rowan, S. et al., 1996, *EMBO J.*, 15, 827-838).

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

La mort cellulaire induite par E2 apparaît être, au moins en partie, indépendante de la répression de la transcription de E6/E7, puisque E2TR a été incapable d'induire un phénotype cellulaire anormal, alors que E2K344 a pu occasionner la mort cellulaire dans certains cas. Le manque d'effet observé avec

5 E2TR peut être expliqué de deux façons. D'une part, E2TR ne réprime pas que la synthèse de E6, mais aussi celle de E7. La modulation inverse de E7 active la protéine rétinoblastome, qui protège les cellules de l'apoptose (Almasan, A. et al., 1995, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 5436-5440; Haas-Kogan, D.A. et al., 1995, *EMBO J.*, 14, 461-472). D'autre part, le niveau de p53 généré par E2TR

10 pourrait ne pas être suffisant pour provoquer la mort cellulaire. Alternativement, une modification additionnelle de p53 induite par la région de transactivation de E2 pourrait être nécessaire.

Dans la présente invention il est montré que E2 induit p53 dans les cellules HeLa par au moins deux voies. L'une est réalisée par la voie de la

15 répression de la transcription de E6/E7 endogène. Dans l'autre voie, E2 active p53 soit à travers une interaction directe, soit à travers un facteur auxiliaire.

La figure 1 représente l'analyse de l'extension d'amorce réalisée avec la sonde spécifique de la protéine E6, sur l'ARN total extrait à partir des cellules transfectées exprimant le marqueur membranaire H2Kd. Les deux protéines E2

20 de HPV18 (voie 5) et BPV-1 (voie 3) ont réduit le niveau de l'ARN spécifique de E6 initié par le promoteur P₁₀₅ (flèches supérieures de la figure 1). Un niveau comparable de répression a été obtenu avec la forme tronquée de la protéine E2 de BPV-1, la protéine E2TR, dans laquelle la majeure partie de la région d'activation amino-terminale manque (voie 2). Les cellules HeLa sont

25 transfectées dans les boîtes de Pétri de 10 cm avec 1 µg du plasmide exprimant H2Kd et 1 µg de l'un des vecteurs codant soit pour la protéine E2 de BPV-1 (voie 3), soit pour la protéine E2TR de BPV-1 (voie 2), soit pour la protéine E2 de HPV18 (voie 5) ou pour un contrôle négatif E1TTL (voies 1 et 4).

β-act. représente la β-actine.

30 La figure 2 (figures 2A, 2B, 2C) montre que E2 active les promoteurs contenant les sites de liaison de p53. L'expression de la protéine E2 complète de

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

BPV-1 dans toute sa longueur a entraîné une augmentation de l'activité de CAT à partir des plasmides dirigés par le promoteur MDM2 répondant à la p53 naturellement, ou un promoteur synthétique contenant 13 sites de liaison pour p53 (PG13-CAT).

5 La figure 2A montre que l'expression de la protéine E2 de BPV-1 dans toute sa longueur a entraîné une augmentation de l'activité de CAT à partir des plasmides dirigés par le promoteur MDM2 répondant à la p53 naturellement, ou un promoteur synthétique encadré par 13 sites de liaison pour p53 (PG13-CAT).

10 La figure 2B montre que la protéine tronquée de p53 a été détectée par immunologie à l'aide de l'anticorps monoclonal Ab421.

La figure 2C montre que l'expression de c-p53 a complètement fait disparaître l'activité transcriptionnelle de p53 induite par E2.

15 La figure 3 montre que E2 n'active pas p53 seulement en réprimant la transcription endogène de E6, car les deux formes tronquées et délétées de E2 ne sont pas capables d'induire l'activation de la transcription dépendante de p53 à des niveaux élevés.

20 La figure 4 représente des analyses par Western Blot (figure 4A). La figure 4 montre que les quantités d'ARN de p53 n'ont pas varié dans les cellules exprimant les deux protéines E2, en comparaison avec les cellules transfectées avec le vecteur de contrôle négatif (Figure 4B). L'action concomitante des deux formes de E2 (E2TR et E2K344) entraîne une activation de p53 aussi bonne que la protéine E2 complète.

25 La figure 5 montre qu'aux concentrations optimales, la protéine E2K344 a induit PG13-CAT 20 fois plus (figure 5A). Cette activation a été 3 fois plus basse et 7 fois plus haute que celle observée avec la protéine sauvage E2 et la protéine tronquée E2TR, respectivement.

30 La figure 5B montre que la perte de l'activité de liaison de l'ADN de la protéine modifiée E2K344 a été confirmée par son incapacité à activer la transcription à partir de TKE2-CAT dans des conditions dans lesquelles la protéine E2 sauvage a activé la transcription jusqu'à 70 fois plus.

La figure 5C montre que l'activation synergique de PG13-CAT par E2K344 et E2TR a été mise en corrélation avec une augmentation du niveau de la protéine p53.

La figure 6 montre que la sous-population 2n (sub-2n) des cellules qui expriment E2 est trois fois plus grande que celle des cellules transfectées avec un plasmide contrôle négatif E1TTL ou un vecteur qui exprime E2TR (figure 6A). La proportion d'ADN sub-2n est indiquée sur la gauche de la figure 6A. La figure 6B représente les photographies de cellules exprimant E2TR (section 1), E2K344 (section 2), ou E2 (sections 3-6). Les noyaux ont été colorés avec de l'iodure de propidium (sections 1-3). Les cellules H2Kd-positives ont été colorées en vert par un anticorps anti-H2Kd couplé à FITC (sections 1-3). Les sections 4 et 5 représentent la même section de cellules colorées soit avec un anticorps couplé avec un rouge Texas qui détecte la protéine E2 (section 4) ou avec DAPI (section 5). Un exemple de noyaux TUNEL-positifs est montré sur la section 6. Les flèches indiquent les cellules transfectées qui montrent des apparences anormales. Une partie des cellules transfectées exprimant la totalité de la protéine E2 (section 3) ou la protéine modifiée E2K344 (section 2) montre une nette réduction de la taille de leur cytoplasme et de leur noyau. Ces apparences anormales n'ont pas été observées dans les cellules transfectées avec E2TR (section 1).

La figure 7 (figures 7A, 7B, 7C) montre que les cellules HeLa ont été transfectées avec 5 µg de PG13-CAT et 0,5 µg du vecteur qui code pour H2Kd, 1,5 µg du vecteur qui exprime E1TTL, E2 de HPV18, ou E2 de BPV-1, avec 1,5 µg d'un plasmide qui code pour c-p53 (partie hachurée de la figure 7) ou pour le vecteur seul (partie blanche de la figure 7). Le pourcentage de cellules en phase G1 a été marqué schématiquement sur la figure 7A. La figure 7C représente la proportion de cellules ayant le contenu en ADN inférieur à 2n. L'activité CAT a été testée sur le dixième de la population cellulaire, la multiplication de l'activité a été relevée sur la figure 7B.

La figure 8 représente la carte de restriction du plasmide pCG(ATG-). La construction de ce plasmide a été décrite par Tanaka et al., Cell, 1990, 60, 375-

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

386. Le plasmide pCG(ATG-) permet d'obtenir le plasmide pCGE2TR et le plasmide pCGE2.18VoNCO.

Le plasmide pCGE2TR est un vecteur d'expression eucaryote contenant un fragment d'ADN de 891 pb correspondant à la séquence de la protéine E2 du papillomavirus BPV-1 tronquée des 2/3 de son domaine N-terminal. Le fragment a été préparé à partir du plasmide pC59 (Spalholz et al, *Cell*, 42, 183-191, 1985), qui exprime la totalité de la protéine E2 de BPV-1. Il est cloné entre les sites *Xba*I et *Bam*HI du vecteur.

Le plasmide pCGE2.18VoNCO est un vecteur d'expression eucaryote contenant la totalité de la séquence de la protéine E2 du papillomavirus HPV-18. Le fragment d'ADN a été préparé à partir du génome viral isolé par Boshart et al, *EMBO J.*, 3, 1151-1157, 1984 et séquencé par Cole et Danos, *J. Mol. Biol.*, 193, 599-608, 1987). La séquence entre les nucléotides 2817 et 3450 du génome a été clonée entre les sites *Xba*I et *Bam*HI du polylinker du vecteur pCG. Le codon ATG d'initiation de la traduction de la protéine E2 a été modifié au cours du clonage par insertion d'un site de restriction NCO.

La figure 9 (figures 9A et 9B) représente la carte de restriction de l'insert E2TR de BPV-1 (SEQ ID NO: 1).

La figure 10 représente la séquence protéique de E2TR qui correspond à la deuxième ligne d'acides aminés (2ème phase de lecture) (SEQ ID NO: 2).

La figure 11 (figures 11A et 11B) représente la carte de restriction de l'insert du plasmide pCGE2.18VoNCO. Dans cet insert, le codon ATG d'initiation de la traduction de la protéine E2 a été modifiée au cours du clonage par insertion d'un site de restriction NCO. La protéine sauvage porte un résidu Q à la position 2, la protéine modifiée qui forme l'insert, porte un résidu E à cette position (SEQ ID NO: 3).

La figure 12 représente la séquence protéique de E2 modifiée qui est exprimée par le plasmide pCGE2.18VoNCO. Cette séquence est située sur la troisième ligne d'acides aminés (3ème phase de lecture) (SEQ ID NO: 4).

La figure 13 (figures 13A à 13Q) représente un alignement des séquences protéiques de divers E2 de HPV.

La figure 14 montre l'expression des gènes injectés dans des tumeurs d'origine humaine.

Des préparations d'ADN ont été directement injectées dans les tumeurs, induites chez les souris nude par l'inoculation sous cutanée d'un million de cellules HeLa. Approximativement 200µg de plasmides différents, dans 50 µl de tampon TE ont été utilisés pour les injections. Les animaux ont été sacrifiés et les tumeurs ont été disséquées 48 heures après l'injection. Les tumeurs ont été préparées et des extraits bruts ont été testés pour déterminer l'activité CAT selon la description donnée dans la partie Matériel et méthodes. A) Test CAT caractéristique. a) plasmide RSV-CAT exprimant CAT ; b) plasmide RSV-β-gal exprimant la β-galactosidase ; c) solution TE. B) Données moyennes de différents essais CAT. Les valeurs relatives ont été calculées en utilisant le pourcentage de conversion du chloramphénicol obtenu dans au moins trois expériences. L'ordonnée représente l'activité relative en CAT.

La figure 15 montre la détection histochimique de l'activité β-galactosidase dans des sections de tumeurs

Les sections de tumeurs injectées ont été obtenues et préparées selon la technique décrite dans matériel et méthode. L'activité β-galactosidase a été détectée en utilisant la coloration X-gal, résultant en une couleur bleu-indigo.

Après coloration, les sections de tissus ont été contre-colorées avec de l'éosine et de l'hématoxyline. Les photos représentant les résultats sont données dans les parties A, B et C, 40X, C, D et E, 60X.

La figure 16 montre l'expression au cours du temps des gènes injectés.

Les tumeurs de chaque groupe d'animaux ont été injectées avec des quantités équivalentes d'ADN et resectionnées 24, 48, 72 et 192 heures plus tard. Les pourcentages de conversion du chloramphénicol ont été utilisés pour calculer les activités relatives. L'ordonnée représente l'activité relative en CAT.

La figure 17 montre la croissance des tumeurs injectées avec différentes préparations d'ADN.

Les volumes de tumeurs ont été calculés à partir de valeurs obtenues selon la description faite dans "Matériel et méthodes". Dans chaque cas, les valeurs moyennes de différentes expériences (+/- erreur standard) sont montrées. Les points indiquent les jours des injections. Les échantillons B et C correspondent aux résultats obtenus à partir des expériences réalisées en double-aveugle.

La figure 18 montre que des injections répétées de plasmides exprimant E2 réduisent la croissance tumorale de la lignée cellulaire humaine exprimant les oncogènes E6 et E7_{HPV18}.

10 Les valeurs obtenues à partir des différentes expériences ont été utilisées pour calculer les valeurs T/C, selon la description faite dans Matériel et Méthodes.

I et II, quatre doses de 100 µg de pC59 chaque ; III, cinq doses (100 µg de pC59 chaque) ; IV, deux doses (200 µg de pC59 chaque) ; V, cinq doses (200 µg de pC59 chaque) ; VI, deux doses de 200 µg de pCGE2; VII, doses multiples de pC59.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants.

20 **EXEMPLE 1**

Constructions des plasmides portant le gène reporteur CAT

Le plasmide p18-4325 contenant le marqueur CAT et le promoteur P₁₀₅ a été décrit par Thierry et al. (New Biol., 1991, 3, 90-100). Ce plasmide contient les séquences de la longue région de contrôle (LCR) du HPV18 située entre les
25 nucléotides 6930 et 120 (Thierry et al., Cancer Cells, 1987, 5, 23-32).

TKE2-CAT, référencé précédemment comme TK-E2BS, contient six sites de liaison E2 avant le promoteur de la thymidine kinase du virus herpes simplex (Thierry et al, Mol. Cell Biol., 1990, 10, 4431-4437).

PG13-CAT contient 13 sites de liaison pour p53 avant le promoteur du
30 polyomavirus, alors que dans MG13-CAT les sites de liaison de p53 ont été modifiés (Kern et al., Science, 1992, 256, 827-830).

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

MDM2-CAT contient le promoteur p53 mdm2 (Moshe Oren).

Le plasmide pC53-SN3 exprime p53 type-sauvage humain (Baker et al., Science, 1990, 249, 912-915)

Les vecteurs pCGE2 (Ustav et al., EMBO J., 1991, 10, 449-457) et
5 pCGE2TR (Demeret et al., J. Virol., 1994, 68, 7075-7082) expriment la protéine E2 de BPV-1.

Le plasmide pCGE2K344 exprime une protéine modifiée venant de la protéine E2 de BPV-1 qui contient une lysine à la place d'une arginine à la position 344.

10 Le génome complet du papillomavirus humain de type 18 (HPV 18) a été décrit par Cole et al. (J. Mol. Biol., 1987, 193, 599-608). La séquence nucléotidiques de la protéine E2 y est totalement décrite.

Le plasmide pCGE2K344 a été construit en sous-clonant un fragment BamHI contenant l'ORF modifié de C59 k3 E2 K344, qui a été décrit par
15 Dowhanik et al., (J. Virol., 1995, 69, 7791-7799) dans un vecteur pCG ayant subi une restriction BamHI (Tanaka et al., Cell, 1990, 60, 375-386).

La protéine E2 de HPV18 a été exprimée à partir du vecteur pCGE2.18 qui a été décrit par Demeret et al. (J. Virol., 1994, 68, 7075-7082).

Le plasmide pCGE2.18VoNCO est un vecteur d'expression eucaryote
20 contenant la totalité de la séquence de la protéine E2 du papillomavirus HPV18. Le fragment d'ADN a été préparé à partir du génome viral isolé par Boshart et al, EMBO J., 3, 1151-1157, 1984 et séquencé par Cole et Danos, J. Mol. Biol., 193, 599-608, 1987). La séquence entre les nucléotides 2817 et 3450 du génome a été clonée entre les sites XbaI et BamHI du polylinker du vecteur pCG. Le codon
25 ATG d'initiation de la traduction de la protéine E2 a été modifié au cours du clonage par insertion d'un site de restriction NCO.

Le papillomavirus bovin de type 1 (BPV-1) code pour deux formes de protéines E2, une de 28 et l'autre de 31 kDa (Lambert et al., Cell, 1989, 50, 69-78). La protéine de 31 kDa, c'est à dire la protéine E2TR, ne contient pas la
30 majeure partie du domaine de transactivation N-terminale. La protéine E2TR a été exprimée à partir du plasmide pCGE2.DBD. Ce plasmide a été construit en

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

sous-clonant le fragment de E2 de BPV-1 (entre les nucléotides 3023 et 3882) à partir du plasmide pC59 (Spalholz et al., 1985, 42, 183-191).

Comme contrôles négatifs, ont été utilisés le plasmide pCGE1.B TTL décrit par Le Moal et al. (J. Virol., 1994, 68, 3151-3154) ou le plasmide pGGE1.18 TTL. Le plasmide pGGE1.18 TTL a été construit en introduisant la séquence TTAGTTAACTAA (SEQ ID NO: 5) qui est un agent de liaison de terminaison de traduction, dans le site Fspl du fragment Taq-BstNI de 2160 pb de la phase ouverte de lecture (ORF) de la protéine E1 de HPV 18, qui a été précédemment cloné dans le plasmide pCG.

10 Le plasmide pPKC.Kd.wt, fourni par Abastado, exprime la molécule H2Kd de MHC classe 1 qui est un antigène de surface, à partir du promoteur précoce de SV40.

Le plasmide CMVgfp exprime une protéine fluorescente verte à partir du promoteur de cytomegalovirus.

15

EXEMPLE 2

Culture de cellules

Toutes les cellules ont été cultivées dans le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Gibco) et contenant de plus 7 % de sérum de veau foetal, de la pénicilline (500 UI/ml) et de la streptomycine (125 µg/ml).

24 heures avant la transfection, $2 \cdot 10^5$ et $5 \cdot 10^5$ cellules HeLa ont été étalées dans des boîtes de Pétri de 6 et 10 cm de diamètre respectivement. De même, $5 \cdot 10^5$ cellules NIH3T3 ont été étalées dans des boîtes de Pétri de 6 cm, de même pour les cellules SAOS-2, HaCaT et SW13. $7,5 \cdot 10^5$ cellules C33 ont été étalées dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre, et $7,5 \cdot 10^5$ cellules HepG2 ont été étalées dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre.

Les transfections ont été réalisées selon la méthode de copréciptation au phosphate-calcium décrite par Desaintes et al. (Oncogene, 1995, 10, 2155-2161).

L'ADN a été préparé selon la méthode de QIAGEN. 6 µg ont été mis en œuvre pour les boîtes de Pétri de 6 cm et 12 µg pour les boîtes de Pétri de 10 cm par transfection avec le plasmide BLUE SCRIBE (de Stratagene).

Les essais CAT ont été réalisés avec 1/10 à 1/2 de l'extrait cellulaire total selon la méthode décrite par Desaintes et al. (J. Virol., 1992, 66, 325-333).

La quantification du chloramphenicol marqué C¹⁴ acétylé a été déterminée avec l'appareil PhosphorImager (Molecular Dynamics).

EXEMPLE 3

10 Western blots

Les cellules HeLa telles qu'obtenues ci-dessus dans les boîtes de Pétri de 10 cm ont été récoltées 40 à 44 heures après la transfection et mises en suspension dans 200 µl de tampon Laemmli. 15 µl de cette suspension ont été placés sur un gel SDS-polyacrylamide 10 % (SDS : sodium dodécyl sulfate).

15 Après le transfert, les membranes de nitrocellulose ont été incubées avec des anticorps conjugués à la peroxidase de raifort primaire et secondaire, en utilisant le kit de détection ECL (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant.

L'antisérum spécifique de la protéine E2 de BPV-1 qui a été décrit par 20 Dostatni et al. (Genes Dev., 1991, 5, 1657-1671) a été utilisé.

L'anticorps monoclonal Ab1801 de p53 qui a été mis en œuvre a été fourni par la société Santa Cruz Biotechnology.

EXEMPLE 4

25 Cytométrie de flux

Les cellules HeLa telles qu'obtenues ci-dessus dans les boîtes de Pétri de 10 cm, ont été recouvertes avec un tampon phosphate (PBS) et 0,1 % d'EDTA puis incubées durant 10 minutes pour détacher les cellules de la gélose de la boîte de Pétri.

30 Les cellules sumageantes ont été récoltées en vue de mesurer le nombre de cellules mortes.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Les cellules ont été incubées pendant 45 minutes à 4°C en présence de tampon PBS, 10⁻⁴ % d'azide et 2 % de sérum de veau fœtal (SVF) avec 1/500 de l'anticorps monoclonal spécifique de H2Kd, l'anticorps SF111 (Pharmingen).

Après lavage, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-souris couplé à FITC 1/500 (Amersham) durant 45 minutes, puis fixées avec 80 % d'éthanol.

Ensuite, les cellules ont été rehydratées dans le tampon PBS et incubées durant 30 minutes à 37 °C en présence d'iodure de propidium (PI) (10 µg/ml) et de RNase (10 µg/ml).

10 Les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytomètre à flux (EPICS XL de la société Coulter) en suivant la procédure recommandée par le fabricant.

Les cellules positives ont été conservées en vue d'une analyse de leur contenu en ADN après exclusion des doublets. Le cycle des cellules a été analysé avec l'appareil MultiCycle Software de la société Phoenix Flow Systems, Inc.

EXEMPLE 5

Immunofluorescence

Les cellules HeLa ont été rincées avec le tampon PBS 24 à 75 heures après la transfection. Puis, elles sont incubées en présence de l'anticorps SF111 (1/500 dans le tampon PBS et 2 % de FCS), puis de nouveau incubées en présence de l'anticorps anti-souris secondaire couplé à FITC. A ce stade, les cellules ont été fixées dans un mélange éthanol-acide acétique 95/5.

Après hydratation, les cellules ont été colorées avec de l'iodure de propidium ou incubées avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre E2 de BPV-1 décrit par Dostatni et al. (Genes Dev., 1991, 5, 1657-1671), puis avec un anticorps anti-lapin couplé à du rouge Texas (Amersham) et DAPI (Sigma Chemicals) 0,15 µg/ml.

EXEMPLE 6

Essai TUNEL

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

40 heures après la transfection, les cellules HeLa ont été fixées dans 4 % de paraformaldehyde durant 30 minutes et rendues perméables durant 2 minutes dans 0,1 % de Triton X-100 et 0,1 % de citrate de sodium.

La réaction TUNEL est réalisée en utilisant le kit de détection des cellules mortes *in situ* (Boehringer Mannheim) en suivant les recommandations du fabricant.

EXEMPLE 7

Extraction de l'ARN

10 Les cellules HeLa ont été transfectées dans les boîtes de Pétri de 10 cm avec 1 µg du vecteur exprimant H2Kd et 1 µg de l'un des plasmides suivants pCGE2(18), pCGE2, pCGE2TR ou pCGE1TTL.

La population de cellules transfectées a été enrichie en sortant les cellules reconnues par l'anticorps anti-H2Kd à l'aide du cytomètre à flux FACS Star Plus
15 (Becton-Dickinson) en suivant les recommandations du fabricant.

L'ARN total a été préparé à l'aide du kit Qiagen RNeasy en suivant les recommandations du fabricant.

5 µg d'ARN ont subi une hybridation avec des amorces marquées au P³² durant 10 minutes à 68 °C et ensuite ont été refroidis lentement jusqu'à la
20 température ambiante. Deux amorces spécifiques ont été utilisées :

- un oligonucléotide de 24 bases complémentaire de la phase ouverte de lecture de la protéine E6 (partie 5') du papillomavirus HPV18, ce nucléotide ayant la séquence suivante :

CTGTAAGTTCCAATACTGTCTTGC (SEQ ID NO: 6)

25 -un oligonucléotide de 25 bases complémentaire de l'ARN de la β-actine humaine, cet oligonucléotide ayant la séquence suivante :

ATCCATGGTGAGCTGGCGGCGGGTG (SEQ ID NO: 7)

La transcription reverse a été réalisée avec l'ARN ayant subi l'hybridation à 37 °C durant 1 heure avec la transcriptase reverse MuLV dans les conditions
30 habituelles décrites par Ham et al. (EMBO J., 1991, 10, 2931-2940). Les produits de la réaction ont été déterminés sur le gel dénaturé.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Pour l'analyse Northern Blot, 5µg d'ARN ont été posés sur un gel MOPS-agarose 1%. Après transfert, les membranes de nitrocellulose ont été hybridées avec une sonde p53 marquée avec du P³². La sonde a été préparée en effectuant 10 cycles de PCR réalisé sur un fragment d'ADNc de p53 humain
5 avec une seule amorce ayant la séquence suivante :

TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG (SEQ ID NO: 8)

Cette amorce hybride avec la terminaison 3' de la phase ouverte de lecture de p53.

10 **EXEMPLE 8**

Les protéines E2 des papillomavirus HPV18 ET BPV-1 répriment la transcription endogène des gènes E6 et E7 dans les cellules HeLa.

Il a été montré dans des essais de co-transfection que les protéines E2 de HPV18 et de BPV-1 répriment l'activité d'un gène reporteur transcrit à partir du
15 promoteur P₁₀₅ du papillomavirus humain HPV18 (Thierry et al., EMBO J., 1987,6, 3391-3397; Thierry et al., New Biol., 1991, 3, 90-100; et Demeret et al., J. Virol., 1994, 68, 7075-7082).

Plusieurs copies de l'ADN du HPV18 ont été introduites dans le génome dans les cellules HeLa. Le promoteur P₁₀₅ transcrit de façon constitutionnelle les
20 oncogènes E6 et E7, comme cela est illustré à la figure 1.

Comme illustré à la figure 1, les cellules HeLa sont transfectées dans les boîtes de Pétri de 10 cm avec 1µg du plasmide exprimant H2Kd et 1µg de l'un des vecteurs codant soit pour la protéine E2 de BPV-1 (voie 3), soit pour la protéine E2TR de BPV-1 (voie 2), soit pour la protéine E2 de HPV18 (voie 5) ou
25 pour un contrôle négatif E1TTL (voies 1 et 4).

L'ARN total a été extrait à partir des cellules transfectées et a subi une transcription reverse avec une amorce qui hybride en amont du site d'épissage dans la phase ouverte de lecture de la protéine E6.

Dans la figure 1, la flèche supérieure indique le produit spécifique E6/E7
30 de 129 nucléotides de l'extension de l'amorce. Une amorce complémentaire de la terminaison 5' de l'ARNm de la β-actine, introduite comme un contrôle interne

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

dans chaque réaction, a révélé un produit de transcription inverse de 93 nucléotides, montrant qu'une quantité équivalente d'ARN total a été utilisée dans chaque voie.

Les cellules n'ont pas exprimé la protéine endogène E2 suite à l'interruption des phases ouvertes de lecture des protéines E1-E2 (Schwarz et al., Nature, 1985, 314, 111-114).

Nous vérifions que la protéine E2 exprimée a été capable de réprimer la transcription de E6/E7 endogène dans les cellules HeLa. Le domaine de régulation du papillomavirus HPV16 intégré dans l'ADN génomique pourrait présenter une structure chromatique différente de celle adoptée sur un plasmide transfecté transitoirement, conduisant à un accès modifié de E2 par ses séquences d'ADN de même origine.

Les cellules réellement transfectées ont été sélectionnées suivant leur réaction immunologique vis à vis de l'antigène de surface, la molécule H2Kd de MHC classe 1, qui est exprimé en même temps que la protéine E2.

L'analyse de l'extension de l'amorce a été réalisée avec la sonde spécifique de la protéine E6, sur l'ARN total extrait à partir des cellules positives H2Kd, comme cela est illustré à la figure 1. Les deux protéines E2 de HPV18 (voie 5) et BPV-1 (voie 3) ont réduit le niveau de l'ARN spécifique de E6 initié par le promoteur P₁₀₅ (flèches supérieures de la figure 1). Un niveau comparable de répression a été obtenu avec la forme tronquée de la protéine E2 de BPV-1, la protéine E2TR, dans laquelle la majeure partie de la région d'activation aminoterminal manque (voie 2). Aucune diminution dans les niveaux d'ARN du gène de contrôle de la β -actine n'a été observée.

Ces résultats montrent que la protéine E2 et la protéine E2TR peuvent toutes les deux réprimer spécifiquement la transcription des protéines E6/E7.

EXEMPLE 9

La protéine E2 augmente l'activité de transcription de p53 dans les cellules HeLa

Les cellules HeLa contiennent deux allèles p53 sauvages. Cependant, malgré l'abondance des transcripts de p53 dans les cellules, la protéine codée n'est pas détectable, parce qu'elle est dégradée lors de la réaction utilisant l'ubiquitine comme intermédiaire, activée par la protéine E6 (Scheffner et al.,
5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 5523-5527).

La p53 endogène active sur la transcription peut être activée quand ces cellules sont exposées à des agents génotoxiques (Butz et al., Oncogene, 1995, 10, 927-936). La protéine E2 peut réprimer l'expression de la protéine E6. On a recherché si cette répression conduisait à une stabilisation de p53.

10 L'activité de p53 a été testée à l'aide de plasmides portant un marqueur CAT.

Comme l'illustre la figure 2A, l'expression de la protéine E2 complète de BPV-1 dans toute sa longueur a entraîné une augmentation de l'activité de CAT à partir des plasmides dirigés par le promoteur MDM2 répondant à la p53
15 naturellement, ou un promoteur synthétique contenant 13 sites de liaison pour p53 (PG13-CAT).

Pour confirmer que l'activation de PG13-CAT a été en fait conduite par l'intermédiaire de p53, un plasmide codant pour un produit de 17 kDa correspondant à la partie carboxy-terminale de p53 (c-p53) a été co-transfecté.
20 Cette protéine tronquée de p53 a été détectée par immunologie à l'aide de l'anticorps monoclonal Ab421 (Oncogene Science) spécifique de p53, qui reconnaît aussi la protéine p53 sur toute sa longueur dans les cellules transfectées avec un vecteur exprimant p53. Ceci est illustré par la figure 2B.

Des formes tronquées courtes agissent comme des mutants trans-
25 dominants-négatifs en formant des oligomères avec la protéine de type sauvage et en conséquence inactivent la transactivation et les fonctions de suppression tumorale de p53 (Shaulian et al, Mol. Cell Biol., 1992, 12, 5581-5592).

L'expression de c-p53 (figure 2C) a complètement fait disparaître l'activité transcriptionnelle de p53 induite par E2. Ceci confirme que l'effet de E2 sur
30 PG13-CAT est permis par p53.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

La figure 2A illustre des essais réalisés avec des extraits de cellules HeLa transfectées avec 2 µg de plasmides portant le marqueur CAT et contenant le promoteur MDM2 ou le promoteur précoce de polyomavirus encadré par 13 sites de liaison p53 (PG13-CAT), et 0,2 µg de plasmides exprimant la protéine E2 de BPV-1.

L'essai avec MDM2-CAT a été réalisé avec 15 fois moins d'extrait que celui avec PG13-CAT.

Les activités relatives CAT ont été 34, 319, 1 et 40 pour MDM2 + E1TTL, MDM2 + E2, PG13 + E1TTL et PG13 + E2, respectivement

La figure 2B illustre les résultats du Western Blot. Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec 1 µg des vecteurs d'expression pour p53, un fragment carboxy-terminal de p53 (c-p53) ou un vecteur seul (-). Les protéines cellulaires totales ont été mises en évidence avec l'anticorps monoclonal Ab42 spécifique de p53. Les flèches indiquent la protéine p53 sur toute sa longueur et c-p53.

La figure 2C illustre l'essai avec la marqueur CAT. Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec 2 µg de PG13-CAT, 0,5 µg des vecteurs d'expression pour la protéine E2 de BPV-1 (voies 3 et 4) ou E1TTL (voies 1 et 2) avec 1 µg d'un plasmide codant pour c-p53 trans-dominant-négatif (voies 2 et 4) ou un vecteur seul (voies 1 et 3). Les essais de marqueur CAT ont été réalisés avec 1/5 des extraits cellulaires pendant 1 heure.

EXEMPLE 10

Les protéines E2 et E2TR diffèrent par leur capacité d'induire p53

La figure 1 montre que la protéine E2 et la protéine tronquée E2TR répriment toutes les deux l'expression de E6 avec des efficacités comparables.

Cet exemple, qui est illustré par la figure 3, montre que E2 n'active pas p53 seulement en réprimant la transcription endogène de E6, car les deux formes tronquées de E2 ne sont pas capables d'induire l'activation de la transcription dépendante de p53 à des niveaux élevés.

La protéine E2 complète de HPV18 (courbes de gauche de la figure 3) et la protéine E2 complète de BPV-1 (courbes de droite de la figure 3) ont augmenté l'activité de PG13-CAT de 30 à 60 fois respectivement. Les formes courtes ont produit seulement une activation modérée de PG13-CAT (jusqu'à 5 à 7 fois pour HPV18 et BPV-1 respectivement). Dans ces conditions, les formes tronquées de E2 (courbes basses 0), HPV18 E2DBD ou BPV-1 E2TR ont réprimé d'une manière qui dépend de la dose, aussi efficacement que leurs protéines correspondantes complètes (courbes basses 0), l'activité du marqueur CAT du plasmide reporteur P₁₀₅.

Les résultats illustrés par la figure 3 ont été obtenus suite à des essais qui ont été réalisés avec des quantités croissantes de plasmides exprimant la protéine E2 complète (symboles noirs sur la figure 3) de HPV18 ou BPV-1 ou des formes tronquées (symboles blancs sur la figure 3) de cette protéine. Ces plasmides ont été transfectés dans des cellules HeLa avec 2µg de PG13-CAT (courbes du haut) ou P₁₀₅-CAT (courbes du bas). Les valeurs qui représentent la moyenne d'au moins 3 à 8 transfections indépendantes ont été calculées par rapport aux activités du marqueur CAT en présence du plasmide pCGE1TTL comme contrôle négatif.

La répression dépendait spécifiquement de l'interaction entre E2 et sa séquence d'ADN cible, comme le montrent les deux essais suivants.

La mutation de trois sites de liaison de E2 les plus proches du promoteur P₁₀₅ a fait totalement disparaître la répression par E2. Une autre mutation ponctuelle qui a détruit la capacité de liaison de l'ADN de la protéine E2 de BPV-1 a affaibli la répression de l'activité de P₁₀₅.

La différence entre les formes complète et tronquée de E2 dans l'activation de p53 n'est pas due à une différence dans le niveau d'expression, puisque les analyses par Western Blot ont montré (figure 4A, section haute) qu'ils les deux produits étaient présents à des concentrations similaires dans les cellules transfectées.

Dans les extraits de cellules transfectées, les deux protéines E2 ont lié les séquences d'ADN cibles avec des efficacités similaires.

La différence dans l'activation de l'activité de transcription de p53 a été mise en corrélation avec le niveau d'équilibre de la protéine p53, comme le montre l'analyse par Western Blot illustrée à la figure 4A (section basse). Cette accumulation de protéine p53 n'a pas résulté d'une activation de transcription du gène, puisque les quantités d'ARN de p53 n'ont pas varié dans les cellules exprimant les deux protéines E2, en comparaison avec les cellules transfectées avec le vecteur de contrôle négatif (Figure 4B).

Pour obtenir les résultats illustrés dans la figure 4, qui montrent que la protéine E2 augmente le niveau d'expression de la protéine p53 sans affecter la transcription du gène qui code pour p53, les essais suivants ont été réalisés. Les cellules HeLa ont été transfectées avec 0,5 µg d'un plasmide exprimant H2Kd et 1,5 µg des vecteurs codant pour E1TTL (-), E2 de BPV-1 ou E2TR de BPV-1. La population de cellules transfectées a été enrichie en sélectionnant les cellules H2Kd-positives. La moitié des cellules a été mise en suspension dans le tampon de Laemmli pour une analyse des protéines, l'autre moitié a été utilisée pour extraire l'ARN. La figure 4A illustre les résultats d'analyse du Western Blot. Les membranes ont été incubées avec un antisérum spécifique de E2 (section haute) ou un anticorps Ab1801 de p53 (section basse). La figure 4B illustre les résultats d'analyse du Northern Blot. 5 µg d'ARN ont été déposés sur un gel MOPS-agarose 1%. Après transfert, la membrane a été incubée avec une sonde spécifique pour p53 et marquée avec P^{32} . Dans la section gauche de la figure 4 B, la flèche indique les transcrits de p53. Les positions des marqueurs de poids moléculaire de l'ARN sont indiquées sur la gauche de la figure 4. La photographie du gel sur la section droite de la figure 4 montre que des quantités équivalentes d'ARNs 18S et 28S étaient présentes dans les trois voies.

Ces résultats montrent que la protéine E2 active la protéine p53 à un niveau post-transcriptionnel et que cela n'est pas seulement dû à la diminution de l'ARNm spécifique de E6 endogène. La répression du promoteur P_{105} (fait pour les deux formes d'E2, la forme complète et la forme ayant été tronquée

dans sa partie N-terminale) n'est pas suffisante pour conférer l'activation totale de p53.

Ceci montre qu'une autre fonction de la protéine E2, qui requiert probablement la présence de la région N-terminale, est aussi impliquée dans
5 l'induction de p53.

EXEMPLE 11

Deux régions de la protéine E2 sont complémentaires du point de vue de leur fonction pour activer la transcription dirigée par p53

10 Le domaine de liaison de l'ADN de E2 seule n'est pas apte pour activer totalement l'activité de transcription de p53.

La séquence de la protéine E2 de BPV-1 a été modifiée par un procédé classique de mutation. L'arginine de la position 344 a été remplacée par une lysine. Cette protéine modifiée a été nommée E2K344. La mutation effectuée se
15 situe dans l'hélice α de reconnaissance de la région carboxy-terminale (Hegde et al., Nature, 1992, 359, 505 -512). Cette mutation entraîne la disparition de la liaison avec l'ADN sans modifier la dimérisation de la protéine (Dowhanick et al., J. Virol., 1995, 69, 7791-7799). Le fait que cette protéine modifiée s'accumule normalement dans le noyau, a été vérifié par immunofluorescence.

20 Aux concentrations optimales, la protéine E2K344 a induit PG13-CAT 20 fois plus, comme l'illustre la figure 5A. Cette activation a été 3 fois plus basse et 7 fois plus haute que celle observée avec la protéine sauvage E2 et la protéine tronquée E2TR, respectivement.

Cependant, la co-expression de 0,2 μ g de E2TR avec des doses
25 croissantes de E2K344 a provoqué une activation synergique (jusqu'à 45 fois) de l'activité de PG13-CAT.

En comparant avec la protéine E2 sauvage, l'activation obtenue avec la combinaison des deux protéines modifiées a exigé une plus grande quantité des plasmides d'expression. L'activation a atteint des niveaux équivalents à des
30 concentrations supérieures à 0,5 μ g. La perte de l'activité de liaison de l'ADN de la protéine modifiée E2K344 a été confirmée par son incapacité à activer la

transcription à partir de TKE2-CAT dans des conditions dans lesquelles la protéine E2 sauvage a activé la transcription jusqu'à 70 fois plus. Ceci est illustré par la figure 5B.

TKE2-CAT est un plasmide contenant un marqueur CAT et six sites de liaison de la protéine E2 en amont du promoteur de la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex.

La co-expression de E2TR et de E2K344 n'a pas activé TKE2-CAT, ceci indique que les deux protéines ne dimérisent pas de façon hétérologue pour reconstituer un transactivateur actif spécifique de la séquence. L'activation synergique de PG13-CAT par E2K344 et E2TR a été mise en corrélation avec une augmentation du niveau de la protéine p53. Ceci est illustré par la figure 5C. Le niveau de p53 était en fait plus élevé dans les cellules exprimant les deux protéines E2TR et E2K344 ensemble, en comparaison avec les cellules transfectées avec le vecteur de contrôle négatif ou l'un des deux plasmides d'expression seul.

La quantité de protéine p53 dans les cellules transfectées par E2 est plus faible que celle s'accumulant dans les cellules transfectées avec un plasmide qui code pour une protéine p53 de type sauvage (SN3).

Ces résultats montrent que l'activation de p53 induite par E2 est gérée par deux voies indépendantes, l'une étant indépendante de la régulation négative de la transcription de E6/E7.

La figure 5 illustre que le domaine de transactivation de E2 et les régions de liaison de l'ADN contribuent de façon synergique à l'activation de p53. Les cellules HeLa ont été transfectées avec des doses croissantes de vecteurs exprimant E2 (losange noir sur la figure 5), E2TR (losange blanc), E2K344 seul (rond blanc) ou en combinaison avec 0, 2 µg de E2TR (triangle blanc), avec 2 µg de plasmides reporteurs PG13-CAT (figure 5A) ou TKE2-CAT (figure 5B). Le plasmide pCGE1TTL a été utilisé comme contrôle négatif. Les essais avec le reporteur CAT ont été réalisés avec des extraits cellulaires à partir des cellules récoltées 44 heures après la transfection. Sur la figure 5 (figures 5A et 5B), les valeurs sont exprimées en comparaison à E1TTL. La figure 5C illustre l'analyse

de Western Blot réalisée avec 1/5 des extraits de cellules transfectées avec 0,2 µg des vecteurs qui codent pour E1TTL, E2, E2TR, p53 humain (SN3), ou 0,8 µg de pCGE2K344 soit seul soit en combinaison avec 0,2 µg d pCGE2TR.

La protéine p53 a été détectée avec l'anticorps Ab1801 (Société Santa Cruz). Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués sur la gauche de la figure 5C en kDa.

Le tableau 1 montre l'amélioration modérée de l'activité de p53 par la protéine E2 dans des lignées cellulaires HPV-négatives.

Pour cet essai, ont été utilisées 7 lignées cellulaires différentes, qui peuvent être divisées en deux catégories selon leur statut vis à vis de p53. Les cellules HeLa, HepG2 et NIH3T3 contiennent des allèles de p53 de type sauvage, les cellules C33, SW13 et HaCaT expriment une forme mutée de p53, et les cellules SAOS n'expriment pas p53 (ATCC n° HTB85).

La présence de p53 endogène actif du point de vue transcription a été confirmée en comparant l'activité de PG13-CAT avec celle de MG13-CAT. MG13-CAT est identique à PG13-CAT à l'exception que les séquences de liaison de p53 ont été modifiées (mutées).

L'expression de E2 dans les cellules HepG2 et NIH3T3 a provoqué une activation de 2 et 2,4 fois du plasmide reporteur PG13-CAT, respectivement.

Au contraire, E2 n'a pas induit une activation de PG13-CAT dans les cellules p53-négatives. Dans des conditions identiques, p53 exogène a induit une activation de PG13-CAT faible dans les cellules SW13, moyenne dans les cellules C33 et forte dans les cellules HaCaT et SAOS.

En introduisant p53 exogène humain de type sauvage, E2 a multiplié l'activité de transcription de PG13-CAT par 2,2 à 4,5 fois dans les quatre différentes lignées cellulaires. L'expression de E2 a induit au moins une multiplication de l'activation par 50 du plasmide TKE2-CAT portant E2. Ces résultats montrent que la protéine E2 pourrait induire l'activité de transcription de p53 dans les lignées cellulaires HPV-négatives, bien qu'à un niveau plus faible que celui observé dans les cellules HeLa.

Tableau 1

5	Cellules	Activités relatives du marqueur CAT		Multiplication de l'activation de PG13-CAT	
		PG13-CAT/MG13-CAT		par p53	par E2
10	HeLa	5		100	30-60 (n=30)
	HepG2	100	2		2 (n=5)
	NIH3T3	8		10,6	2,4 (n=6)
	C33	0,3		12,4	3 (n=2) a
	SW13	1		3,3	4,5 (n=7) a
	HaCaT	1		50	3 (n=9) a
	SAOS	1		50	2,2 (n=2) a
15					

Pour les essais conduisant au tableau 1, les cellules ont été transfectées avec MG13-CAT ou PG13-CAT ensemble avec des plasmides qui codent pour le contrôle négatif E1TTL, E2 ou p53 sauvage humain. Le niveau de l'activité de transcription p53 endogène a été déterminé en comparant les activités du reporteur CAT dans les cellules transfectées avec PG13-CAT ou MG13-CAT. L'activation de PG13-CAT par E2 ou p53 a été calculée en comparaison avec le contrôle négatif E1TTL. Les valeurs moyennes des activités ou le niveau de l'activation ont été indiquées dans le tableau 1.

Dans le tableau 1, a signifie que dans les lignées cellulaires HPV-négatives, le plasmide exprimant p53 humain a été co-transfecté avec PG13-CAT et pCGE2 ou pCGE1TTL; et n représente le nombre d'essais de transfection indépendants réalisés.

EXEMPLE 12

E2 induit l'apoptose

Thierry et al. (EMBO J., 1987, 6, 3391-3397) ont décrit l'impossibilité d'obtenir des clones de cellules HeLa qui expriment E2 de façon stable. De plus, dès le début de la transfection, E2 présente un effet toxique sur les cellules. Dans certaines circonstances, il a été montré que l'activation de p53 induit l'apoptose (Diller et al., Mol. Cell Biol., 1990, 10, 5772-5781 et Yonish-Rouac et al., Nature, 1991, 352, 345-347). On a donc recherché si l'expression de E2 entraînerait la mort cellulaire.

Les cellules HeLa ont été mises en culture dans des boîtes de Pétri de 10 cm puis ont été transfectées avec 1,5 µg de pCGE1TTL, pCGE2 ou pCGE2TR, et 0,5 µg du plasmide exprimant H2Kd.

40 heures après la transfection, les cellules réellement transfectées ont été mises en présence d'un anticorps couplé avec de l'isothiocyanate (FITC) de fluoresceine H2Kd. Puis, leur contenu en ADN a été déterminé par cytométrie de flux.

La figure 6A montre que la sous-population dont le contenu en ADN est inférieure à 2n (sub-2n) des cellules qui expriment E2 est trois fois plus grande que celle des cellules transfectées avec un plasmide contrôle négatif E1TTL ou un vecteur qui exprime E2TR. La proportion d'ADN sub-2n est indiquée sur la gauche de la figure 6A.

La sous-population sub-2n correspond aux cellules qui ont perdu leur matériel génomique suite à la mort cellulaire. L'effet de E2 sur les cellules et la morphologie du noyau a été examiné par immunofluorescence. Ceci est illustré par la figure 6B. La figure 6B représente les photographies de cellules exprimant E2TR (section 1), E2K344 (section 2), ou E2 (sections 3-6). Les noyaux ont été colorés avec de l'iodure de propidium (sections 1-3). Les cellules H2Kd-positives ont été colorées en vert par un anticorps anti-H2Kd couplé à FITC (sections 1-3). Les sections 4 et 5 représentent la même section de cellules colorées soit avec un anticorps couplé avec un rouge Texas qui détecte la protéine E2 (section 4) ou avec DAPI (section 5). Un exemple de noyaux TUNEL-positifs est montré sur la section 6. Les flèches indiquent les cellules transfectées qui montrent une apparence anormale. Une partie des cellules transfectées exprimant la totalité de

la protéine E2 (section 3) ou la protéine modifiée E2K344 (section 2) montre une nette réduction de la taille de leur cytoplasme et de leur noyau. Ces apparences anormales n'ont pas été observées dans les cellules transfectées avec E2TR (section 1).

5 L'expression de E2 a aussi été visualisée en colorant directement les cellules avec un anticorps anti-E2 couplé à du rouge Texas (section 4). Les mêmes cellules ont été colorées avec le 4,6-diaminodino-2-phénylindole (DAPI), ceci montre deux cellules E2-positives ayant une chromatine condensée (flèches dans la section 5).

10 De plus, les cellules transfectées avec les vecteurs qui expriment E2 contenaient des coupures d'ADN qui ont été mises en évidence lors de l'essai TUNEL (section 6). Les cellules TUNEL-positives ont représentées 7,5, 12 et 50 % de la proportion des cellules H2Kd-positives qui expriment E1TTL, E2TR et E2 respectivement.

15 L'expression de la protéine E2 de HPV18 a également conduit à une apoptose, comme le montrent la condensation de la chromatine, la teneur en ADN de la sous-population sub-2n et les résultats de la réaction TUNEL.

La méthode pour réaliser la réaction de TUNEL est décrite par Wang et al. , Cancer Gene Ther., 1995, 2, 9-17.

20 Ces résultats montrent que la protéine E2 induit la mort cellulaire par apoptose. La mort cellulaire n'est pas due de façon non-spécifique à une surproduction de protéine dans le noyau, puisque les faits caractéristiques de l'apoptose (mort cellulaire, fragmentation de l'ADN et condensation de la chromatine) n'étaient pas au dessus du niveau du bruit de fond dans les cellules
25 exprimant E2TR.

EXEMPLE 13

L'activité de transcription de p53 est nécessaire pour l'arrêt de la croissance en phase G1 induit par E2, mais on peut s'en passer pour
30 l'apoptose provoquée par E2

L'augmentation de p53 accroît ou bloque la progression au niveau de la phase G1 ou induit l'apoptose (Elledge et al., Cell, 1993, 75, 817-825; Xiong et al., Nature, 1993, 366, 701-704; Harper et al., Mol. Biol. Cell, 1995, 6, 387-400) ou induit l'apoptose (Diller et al., Mol. Cell Biol., 1990, 10, 5772-5781 et Yonish-Rouach et al., Nature, 1991, 352, 345-347).

Il a déjà été montré que l'expression de E2 stoppe les cellules HeLa et HT3 en phase G1 (Hwang et al, 1993, et Dowhanick et al, 1995) pour voir, ensuite, le rôle de p53 dans l'apoptose induite par E2 et l'arrêt de croissance en phase G1, l'activité transcriptionnelle de p53 a été inhibée en co-exprimant c-p53 (mutant de p53 trans-dominant négatif) en présence de E2.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 5 µg de PG13-CAT et 0,5 µg du vecteur qui code pour H2Kd, 1,5 µg du vecteur qui exprime E1TTL, E2 de HPV18, ou E2 de BPV-1, avec 1,5 µg d'un plasmide qui code pour c-p53 (partie hachurée de la figure 7) ou pour le vecteur seul (partie blanche de la figure 7).

40 heures après la transfection, les cellules H2Kd-positives ont été marquées avec de l'iodure de propidium et analysées par cytométrie de flux pour déterminer leur contenu en ADN.

Les cellules ont été mises en présence d'un anticorps couplé avec du FITC spécifique pour le marqueur de surface H2Kd codé par un plasmide co-transfecté.

Le pourcentage de cellules en phase G1 a été marqué schématiquement sur la figure 7A. La figure 7C représente la proportion de cellules ayant un contenu en ADN inférieur à 2n. L'activité CAT a été testée sur le dixième de la population cellulaire, la multiplication de l'activité a été relevée sur la figure 7B.

Comme illustré par la figure 7, l'expression transitoire des protéines E2 de HPV18 et de BPV-1 (figure 7A) a augmenté la proportion de cellules bloquées en phase G1 (70 et 73,5 % pour HPV18 et BPV-1 respectivement, en comparaison avec 55,1 % pour les cellules transfectées avec le plasmide contrôle négatif. La co-expression de c-p53 dominant-négatif (partie hachurée de la figure 7) a presque complètement libéré le blocage de G1 induit par E2, dans des

conditions telles qu'elle a complètement fait disparaître l'activité de transcription de p53 (figure 7B).

L'apoptose induite par E2 a été contrôlée par la proportion de cellules ayant un contenu d'ADN inférieur à 2n. Les cellules exprimant E2 de HPV18 et BPV-1 ont représenté une sous-population sub-2n de 15,8 % et 19,4 % respectivement, en comparaison avec 7 % pour les cellules faisant partie du contrôle négatif (figure 7C).

Cependant, l'augmentation de l'apoptose induite par E2 n'a pas été affectée par la co-expression de c-p53 dominant-négatif; au contraire, elle a été un peu augmentée.

Ces résultats montrent que l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 observés dans les cellules transfectées avec E2 se déroulent par des voies différentes et que l'arrêt du cycle cellulaire implique que p53 soit actif du point de vue de la transcription.

L'apoptose induite par E2 n'exige pas que p53 soit actif du point de vue de la transcription. Les cellules C33 qui ont comme origine un carcinome du col de l'utérus HPV-négatif, les cellules HaCaT ou SAOS, pour toutes lesquelles il manque p53 fonctionnel, ont été transfectées avec les vecteurs exprimant E1TTL, E2 ou p53 humain de type sauvage, en même temps que des plasmides qui codent pour une protéine de fluorescence verte et H2Kd.

20 à 40 heures après la transfection, l'apoptose a été déterminée en comptant le nombre de cellules vertes mortes.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2. Les valeurs notées sont la moyenne de plusieurs tests de transfection indépendants, n représente le nombre de tests indépendants réalisés.

Le tableau 2 montre que E2 n'induit pas l'apoptose dans les lignées cellulaires p53-négatives.

	Cellules	E1TTL	E2	p53
5	HaCaT (n=3)	17	16	27
	C33 (n=4)	18	17	23
	SAOS (n=3)	17	17	47

E2 n'a pas augmenté le pourcentage de cellules mortes en comparaison
10 avec le contrôle E1TTL, dans les trois lignées cellulaires, alors que p53 a
augmenté de façon significative le niveau de l'apoptose dans les cellules SAOS
et HaCaT, et dans une moindre mesure dans les cellules C33.

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse FACS et l'analyse TUNEL.

Ces essais montrent que la protéine E2 seule n'est pas suffisante pour
15 déclencher la mort cellulaire, et que l'apoptose induite par E2 nécessite la
présence de p53 sauvage.

EXEMPLE 14

Cet exemple rapporte l'expression dans des tumeurs d'origine humaine
20 produites dans des souris nude, de gènes injectés directement dans ces tumeurs
sous forme de préparations d'ADN porté par des plasmides. Plusieurs
constructions d'ADN contenant des gènes reporteurs, sous le contrôle de
différents promoteurs viraux ou cellulaires, ont été injectés dans des tumeurs
humaines produites par des souris nude. L'expression a été mesurée par
25 coloration différentielle in situ de β -galactosidase dans des sections des tumeurs,
ou en réalisant des tests impliquant l'acétyl-transférase de chloramphénicol
(CAT). On a montré que l'expression était fortement spécifique et dépendait de la
force du promoteur dirigeant l'expression du gène reporteur. En outre, les
niveaux d'expression obtenus avec les préparations d'ADN ont été comparés,
30 lorsque ces préparations ont été soit directement injectées, soit administrées à

l'aide de liposomes ; aucune différence significative n'a été observée entre ces modes d'administration.

A la suite de ces observations, l'utilisation potentielle de préparations d'ADN contenant le gène E2 de papillomavirus, a été évaluée en vue de réduire la croissance tumorale de lignées cellulaires d'origine humaine exprimant les oncogènes E6 et E7. Des injections multiples de plasmides contenant le gène E2 ont permis de réduire significativement la croissance tumorale de cellules HeLa, ces cellules constituant une lignée dérivée des cellules du col de l'utérus connues pour leur capacité à exprimer les oncogènes viraux E6 et E7.

La lignée de cellules HeLa est certainement la lignée de cellules utérine la mieux connue, cette lignée dérivant à l'origine d'un adénocarcinome du col de l'utérus et contenant des séquences intégrées de HPV18. Dans ces cellules on a observé l'expression active des oncogènes E6 et E7 alors qu'un grand segment viral incluant les gènes E1 et E2 est délété. (Schwarz et al, *Nature* 314:111, 1985), Schneider Gädick et Schwarz, *EMBO J.* 5:2285, 1986).

Des observations antérieures ont montré que l'expression permanente du gène E2 est toxique pour ces cellules, (Thierry et Yaniv, *EMBO J.* 6:391, 1987) et que son introduction inhibe la prolifération cellulaire probablement en bloquant la progression de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire (Hwang et al, ...).

Les cellules HeLa contenant les plasmides exprimant les ARN antisens E6 et E7 ont montré une croissance tumorale plus faible et une capacité réduite à former des colonies dans de l'agar mou, ainsi qu'un besoin accru en sérum, confirmant l'importance de l'expression des oncogènes viraux pour le maintien de leur phénotype d'immortalisation (Steele et al., *Cancer Res.* 52, 4706-4711, Von Knebel Doeberitz et al., *Cancer Res.* 48, 3780-3786).

METHODES

Plasmides

Les plasmides utilisés contenaient soit les gènes reporteurs, lacZ ou CAT, soit le gène E2 de papillomavirus bovin de type 1 (BPV-1), sous forme mutée ou

normale, sous le contrôle de différents promoteurs incluant : le promoteur précoce SV40 (SVE), la séquence LTR du virus du Sarcome de Rous (RSV), la région de régulation amont (URR) du papillomavirus humain de type 18 (HPV18), et le promoteur précoce immédiat du cytomégalo virus (CMV). Ces promoteurs
5 ont été décrits respectivement dans les publications suivantes, Thierry and Yaniv, (1987) *EMBO J.* 6:3391, Cid et al., (1993), *J. Virol.* 67, 6742-6752, Ustav and Stendlund, (1991), *EMBO J.* 10,449-457, Yang et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1030-1034, Spalholz et al., (1985), *Cell* 42:183.

Les plasmides contenant le gène E2 ont été préparés par des méthodes
10 conventionnelles et extraits soit à l'aide d'un mélange phénol/chloroforme soit purifiés dans des gradients de CsCL, selon la description faite par Maniatis et al, 1987.

Les plasmides contenant le gène E2 contenaient soit le promoteur SVE (pC59 et pC9), soit le promoteur du CMV (pCGE2).

15

Cellules

Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM; GIBCO) complété avec 10 % de sérum foetal bovin dans une atmosphère comprenant 5 % de CO₂. 1 x 10⁶ cellules ont été injectées dans un
20 milieu dépourvu de sérum dans 200 µl; la viabilité a été mesurée par l'exclusion au Bleu Trypan; elle excédait en principe 95 %.

Détection Histochimique de l'activité β-galactosidase dans les sections de tumeurs

25 Les tumeurs ont été fixées pendant 60 à 90 minutes dans un tampon phosphate salin (PBS : 150 mM NaCl, 15 mM phosphate de sodium [pH 7,3]), contenant 2 mM MgCl₂, 2% paraformaldehyde, et 0,2 % de glutaraldehyde. Après lavage deux fois dans du PBS-MgCl₂ (PBS contenant deux mM MgCl₂) les tumeurs ont été saturées dans la même solution contenant 30 % de sucros
30 pendant 6 à 12 heures à 4° C puis congelées dans un milieu "Tissue-Tek" (Milles).

Les sections congelées (10 mm) ont été séchées à l'air, lavées dans du PBS-MgCl₂ contenant 0,02 % de Nonidet P40 (NP-40), 0,01% de desoxycholate de sodium et refixées pendant 5 minutes avec une solution de fixation. Les sections ont été recouvertes avec une solution contenant 1 mg/ml de X-Gal (5-bromo-4chloro-3indolyl-β-D-glalactopyranoside; SIGMA); 5 mM de ferricyanure de potassium; 2 mM MgCl₂; 0,01 % de desoxycholate de sodium et 0,02 % de NP-40. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 12 à 16 heures.

Test de l'activité CAT dans les extraits de tumeurs

10 Les tumeurs (approximativement 0,1-0,3 mm³) ont été homogénéisées avec un Polytron dans 300 ml de solution TGD (Tris [pH:8]; 15% glycerol; 5 mM TT), puis soumises à 6 cycles de congélation-fusion, puis centrifugées pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été chauffés pendant 10 minutes à 65°C pour inactiver les acétylases et centrifugés à nouveau pendant 5 minutes à 4°C.

15 Les surnageants résultant constituaient les extraits bruts utilisés ultérieurement pour déterminer la concentration de protéine et l'activité CAT.

La protéine totale a été normalisée et chaque extrait complété jusqu'à 300 µl avec une solution Tris (250 mM Tris [pH 8]). Puis, 8 ml d'acétyl coenzyme A 20 mM et 0,06 mCi de chloramphénicol C¹⁴ (Amersham, UK) ont été ajoutés et le milieu de réaction a été incubé pendant 1 heure à 37°C. De l'acétyl coenzyme A a ensuite été ajouté et l'incubation a été poursuivie pendant une heure supplémentaire. Les échantillons ont été chromatographiés sur des plaques de gel de silice en couches minces, dans un milieu contenant du chloroforme et du méthanol (19:1), puis les échantillons ont été exposés à un film de Rayon-X.

25

Analyse de la croissance tumorale

Pour déterminer la taille de la tumeur, la longueur (L : la dimension la plus longue) et l'épaisseur (W : la distance perpendiculaire à la longueur et dans le même plan que la longueur) de chaque tumeur ont été mesurées avec des Verniers tous les 2 ou 3 jours selon la description faite par Tomayko & Reynolds, (1989, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 24:148). Les volumes de

tumeurs (V) ont été calculés en utilisant la formule $V = L \times W^2/2$, selon la description de Osborne et al. (1984).

Dans certaines expériences, les personnes réalisant soit les injections d'ADN, soit les mesures sur les tumeurs n'ont pas été informées de l'origine des solutions employées pour chaque animal. Dans ces cas, les résultats ont été

5 groupés après décodage de l'information à la fin de chaque expérience.

RESULTATS

Les gènes sont exprimés lorsqu'ils sont injectés dans des tumeurs

10 d'origine humaine

Tout d'abord, l'analyse a été faite de l'expression éventuelle des gènes reporteurs, après leur injection dans des tumeurs produites par des souris nude, ces tumeurs étant obtenues à partir de lignées cellulaires d'origine humaine. Les tumeurs produites par des injections sous-cutanées de cellules HeLa fortement

15 tumorigènes, ont en outre subi une injection avec différentes préparations de plasmides contenant les gènes reporteurs. Les plasmides contenant le gène lacZ, sous le contrôle transcriptionnel de la séquence (LTR) du Virus de Sarcome de Rous (RSV), ou sous le contrôle du promoteur de la β -actine, ou de la région régulatrice amont (URR) du HPV18 ont été utilisés. Un plasmide contenant le

20 gène CAT, sous le contrôle de la séquence LTR du RSV a également été utilisé. Dix jours après l'injection des cellules HeLa, des tumeurs (approximativement 0,5 mm³) ont été injectées avec 200 μ g de chaque plasmide, et resectionnées trois jours plus tard.

L'expression efficace des gènes lacZ et CAT a été observée dans les

25 tumeurs ayant subi l'injection comme le montrent les figures 14 et 15. Une activité CAT significative a été observée uniquement lorsque le plasmide contenant ce gène, sous le contrôle de la séquence LTR du RSV, a été utilisé (Figure 14A). L'injection dans plusieurs tumeurs, de différents plasmides contenant le gène lacZ ou l'injection d'un tampon, a conduit à l'obtention d'un

30 bruit de fond correspondant à celui observé lors de l'expression du gène CAT comme le montre la figure 14B.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

La détection histochimique de l'activité β -galactosidas a révélé que la séquence LTR du RSV et le promoteur de la β -actine étaient capables de diriger de façon significative l'expression du gène lacZ et a confirmé l'expression spécifique du gène injecté (Figure 15, comparaison des échantillons A, B et C). Il est important de noter que dans le cas antérieur, l'activité β -galactosidase était localisée principalement dans le cytoplasme conformément à ce que l'on pouvait attendre (Figures 15 A et D). Lorsqu'une construction similaire contenant le gène lacZ, contrôlée par le promoteur de la β -actine mais contenant un signal de localisation nucléaire (NLS) dans la séquence codante de la β -galactosidase était utilisée, l'activité était principalement détectée dans le noyau comme le montre la Figure 15C, E et F. Non seulement l'expression a été détectée lorsque les constructions contenant le gène lacZ étaient utilisées mais l'activité a été localisée de façon différentielle (voir les Figures 15 échantillons A et D comparées avec les échantillons C, E et F).

Ces résultats permettent la conclusion selon laquelle les gènes reporteurs sont efficacement exprimés lorsqu'ils sont injectés dans des tumeurs produites par des lignées cellulaires d'origine humaine dans des souris nude.

Conditions affectant l'expression des gènes injectés

Pour observer les conditions affectant l'expression des gènes injectés, des expériences ont été réalisées sur une certaine durée et l'efficacité de différentes méthodes d'administration de l'ADN dans les tumeurs a été analysée.

Le protocole suivant a été utilisé pour rechercher si l'expression observée des gènes injectés variait sur différentes périodes de temps. Douze souris ont été injectées avec des cellules HeLa puis on a laissé les tumeurs se former et ensuite 200 μ g de plasmide RSV-CAT ont été injectés dans chaque tumeur. Les animaux ont été sacrifiés 1, 2, 4 et 8 jours après l'injection du plasmide et l'activité CAT a été testée pour chaque tumeur. La figure 16 montre au fil du temps, l'émergence de l'activité CAT dans chaque groupe de trois animaux,

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

montrant une activité maximum deux jours après l'injection d'ADN (Figure 16B); après 8 jours, une activité encore considérable était observée (Figure 16D).

Le niveau d'expression obtenu a été comparé en injectant les préparations d'ADN obtenues selon différentes méthodes. L'injection directe a été comparée à l'administration d'ADN par l'intermédiaire de liposomes. Les animaux ont été injectés avec des cellules humaines selon ce qui a été décrit précédemment et lorsque les tumeurs ont été formées, des quantités égales d'ADN ont été injectées soit directement, soit sous la forme de particules de liposomes ou d précipités de phosphate de calcium. Trois jours plus tard, les tumeurs ont été resectionnées et l'activité CAT a été testée dans des extraits bruts.

Des efficacités comparables de l'expression ont été obtenues après transfert de gènes par l'intermédiaire de liposomes ou directement dans les tumeurs humaines

Des quantités égales (200 µg) de plasmides pRSV-CAT exprimant CAT ont été soit non traités soit utilisés pour préparer des liposomes et des précipités de phosphate de calcium puis ultérieurement injectés dans les tumeurs.

A : ADN injecté seul, L : préparation de liposomes, P : précipités de phosphate de calcium.

Des niveaux comparables d'activité ont été observés selon que les injections avaient été faites directement ou au moyen de liposomes, alors que les injections faites avec les précipités de phosphate de calcium, ont conduit à des niveaux seulement légèrement supérieurs au bruit de fond.

L'injection du gène de régulation E2 réduit la croissance des tumeurs induites par les cellules humaines exprimant les oncogènes viraux E6 et E7

Les observations rapportées précédemment suggèrent l'utilisation potentielle de plasmides exprimant E2 pour réduire la croissance tumorale de lignées cellulaires humaines exprimant les oncogènes E6 et E7 de HPV. Cette possibilité a été explorée en injectant des préparations d'ADN de différents plasmides exprimant E2, pour réprimer la transcription des oncogènes de HPV et par conséquent pour réduire la croissance de tumeurs dans des souris nude.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Des jeunes souris (âgées de 4 à 8 semaines) dépourvues de thymus (Swiss nu/nu) ont été inoculées par voie sous-cutanée avec un million de cellules H La (dérivées d'un adénocarcinome du col) ; ces souris ont été réparties au hasard dans différents groupes et soumises à différents protocoles. Les tumeurs
5 (trois animaux par groupe) ont été injectées avec différentes quantités d'plasmides ou avec un tampon seul, à différents intervalles.

Dans le premier groupe d'expériences, la croissance des tumeurs injectées avec 200 µg de plasmide contenant le gène CAT sous le contrôle transcriptionnel de la séquence LTR du RSV (pRSV-CAT), a été comparée à la
10 croissance des tumeurs injectées avec la même quantité de plasmide exprimant le gène E2 (pC59). Comme le montre la figure 17A, les tumeurs injectées avec pC59 (exprimant E2) présentent une croissance plus faible que celles injectées avec pRSV-CAT.

Dans la seconde série d'expériences, les tumeurs des animaux de chaque
15 groupe ont été injectées soit avec le gène E2 sauvage (pC59) soit avec un plasmide exprimant un mutant E2 (pC9). Dans ce cas, la séquence d'un linker de terminaison de traduction (TTL) a été insérée dans le gène E2, de façon à obtenir une protéine E2 tronquée et non fonctionnelle (Spalholz et al., 1985, *Cell* 42:183). Comme le montre la figure 17B, les tumeurs injectées avec le gène E2
20 mutant avaient une croissance plus importante que celles injectées avec le gène E2 de type sauvage. Dans cette expérience, la fréquence des injections a été augmentée de telle sorte que les animaux ont reçu un total de 7 injections pendant l'expérience. Il est important de mentionner que ces séries d'expériences ont été conduites en double-aveugle.

25 Finalement, une expérience similaire a été conduite avec des animaux d'un groupe injecté avec un tampon seul, les animaux d'un second groupe injectés avec la forme mutante de E2 et les animaux d'un troisième groupe injectés avec le plasmide contenant E2 mais sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus (pCGE2) et exprimant des niveaux élevés de la protéine E2
30 (Ustav et Stendlund, 1991, *EMBO J.* 10, 449-457). Comme le montre la Figure 17C, bien que les animaux aient reçu seulement deux injections pendant la

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

duré totale de l'expérience, la croissance tumorale a été significativement réduite chez les animaux ayant subi une injection avec le plasmide exprimant de hauts niveaux de protéine E2. Cette dernière expérience a aussi été réalisée en double-aveugle (voir Matériel et méthodes). Dans certaines de ces expériences, l'expression de E2 dans les tumeurs a été confirmée en utilisant un anticorps polyclonal.

En conclusion, il était clair à partir de ces expériences que l'injection de préparations d'ADN obtenues à partir de plasmides exprimant E2, conduisait à une croissance réduite des tumeurs des cellules HeLa, connues pour exprimer les oncogènes E6 et E7 de HPV18.

DISCUSSION

Comme on l'a mentionné précédemment, les oncogènes E6 et E7 sont capables d'immortaliser des cellules primaires humaines. La majorité des lignées cellulaires dérivées de tumeurs de la région génitale contient et exprime ces oncoprotéines virales. Leur expression continue est responsable du phénotyp d'immortalisation et de transformation observé.

Des ARNs antisens spécifiques de E6 et E7 sont capables d'altérer les propriétés de croissance de plusieurs lignées cellulaires exprimant les oncogènes E6 et E7 de HPV18.

L'infection des cellules HeLa, de même que l'infection d'autres lignées cellulaires d'origine du col avec les virus SV40 recombinants, contenant le gène E2, a conduit à l'inhibition de leur croissance, due à un arrêt de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire, avec une augmentation concomitante de leurs niveaux de protéines p53 et Rb (protéine du rétinoblastome). L'introduction d'un gène E2 est apparemment toxique pour les cellules HeLa (Thierry et Yaniv (1987), *EMBO J.* 6:3391).

Ces résultats suggèrent que l'expression continue d'oncogènes E6 et E7 est incompatible avec l'expression permanente de E2. Ce fait peut facilement être relié aux nombreuses observations suggérant un avantage sélectif de la perte de E1 et E2 pendant la progression tumorale. En effet, il a été montré par

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

les inventeurs que les tumeurs testées positives pour HPV18 avaient perdu cette région. Dans le cas des tumeurs comprenant des séquences HPV16, seulement la moitié retient la région E1/E2.

Les expériences effectuées ont montré que les gènes injectés sont
5 efficacement exprimés dans des tumeurs d'origine humaine. En comparant à d'autres méthodes employées actuellement pour traiter d'autres types de néoplasies humaines, telles que les méthodes recourant à la préparation de liposomes, des niveaux d'activités similaires ont été observés. Bien que l'expression des gènes injectés soit plus faible, après comparaison avec des
10 méthodes fondées sur une approche recourant à une administration virale, il apparaît qu'il pourrait être très utile de procéder à des traitements de certaines tumeurs malignes humaines à l'aide des moyens décrits précédemment, essentiellement du fait de leur simplicité et de leur efficacité.

En utilisant ces observations, un plasmide exprimant le gène viral E2 a été
15 injecté dans des tumeurs d'origine humaine, produites dans des souris nude, pour réduire leur croissance. Des cellules HeLa ont été inoculées à des animaux nude et les tumeurs ont été injectées avec différentes préparations de plasmides exprimant E2. L'inhibition de la croissance tumorale a été observée lorsque les plasmides exprimant le gène E2 intact étaient utilisés. L'inhibition de l'expression
20 de E6 et E7 a été montrée lorsque E2 était exprimé de façon concomitante. L'introduction du gène E2 conduit à l'arrêt de la croissance des cellules qui expriment en continu ces oncogènes.

L'expression continue de E2 semble incompatible avec l'expression concomitante d'oncogènes viraux. Puisque l'expression de E6 et E7 est
25 nécessaire au maintien du phénotype immortalisé des cellules tumorales, E2 pourrait être très utile pour la mise en oeuvre d'une thérapie génique des tumeurs du col de l'utérus qui affectent un grand nombre de femmes dans beaucoup de pays.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant une protéine E2 de papillomavirus ou une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 de papillomavirus, et un véhicule physiologiquement acceptable.
- 5 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la protéine E2 est une protéine dont la séquence est modifiée par rapport à celle de la protéine E2 sauvage, ou en ce que la séquence de nucléotides est modifiée par rapport à la séquence sauvage, de telle sorte que la protéine E2 résultante a substantiellement l'activité biologique de la protéine E2 sauvage sur
10 l'accumulation de la protéine cellulaire p53.
3. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la protéine E2 est une protéine dont la séquence est modifiée par rapport à celle de la protéine E2 sauvage, ou en ce que la séquence de nucléotides est modifiée par rapport à la séquence sauvage, de telle sorte que la protéine E2 résultante
15 participe à une activité biologique d'apoptose de cellules infectées par un virus de type papillomavirus.
4. Composition selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que la séquence de la protéine est modifiée dans la région responsable de la réplication virale, ou la séquence de nucléotides est modifiée dans la région
20 responsable de la réplication virale, de telle sorte que la protéine E2 résultante est défective pour la réplication virale de papillomavirus.
5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le papillomavirus est un papillomavirus humain, notamment un papillomavirus du groupe comprenant HPV16, HPV18, HPV31 et
25 HPV33.
6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le papillomavirus est un papillomavirus bovin, notamment un papillomavirus BPV-1.
7. Séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 d
30 papillomavirus HPV18, caractérisée en ce que le résidu situé à la position 2 dans la séquence de la protéine E2 est un résidu acide glutamique.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

8. Séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 de papillomavirus humain, ladite protéine comprenant une séquence d'acides aminés dont au moins un résidu choisi parmi les suivants a été modifié, notamment par substitution :

- 5 - le résidu proline en position 288,
- le résidu glycine en position 294,
- le résidu asparagine en position 297,
- le résidu lysine en position 300,
- le résidu cystéine en position 301,
- 10 - le résidu leucine en position 302,
- le résidu arginine en position 305.

9. Vecteur comprenant une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 7 ou 8.

10. Vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est choisi
15 parmi le groupe des vecteurs formé par un plasmide, un virus, et un vecteur synthétique.

11. Vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce que le virus est un adénovirus.

12. Plasmide pCGE2.18VoNCO déposé à la C.N.C.M. le 29 janvier
20 1997 sous le numéro I-1839.

13. Protéine E2 de papillomavirus HPV18, caractérisée en ce que le résidu situé à la position 2 dans la séquence de la protéine est un résidu acid glutamique.

14. Protéine E2 de papillomavirus, caractérisée en ce qu'elle comprend
25 une séquence d'acides aminés dont au moins un résidu choisi parmi les suivants a été modifié, notamment par substitution :

- le résidu proline en position 288,
- le résidu glycine en position 294,
- le résidu asparagine en position 297,
- 30 - le résidu lysine en position 300,
- le résidu cystéine en position 301,

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

- le résidu leucine en position 302,
- le résidu arginine en position 305.

15. Composition pharmaceutique comprenant une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 7 ou 8, ou un vecteur selon l'une
5 quelconque des revendications 9 à 11, ou une protéine selon l'une des revendications 13 ou 14, ou une protéine E2TR et un véhicule physiologiquement acceptable.

16. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 15 pour l'utilisation comme médicament.

10 17. Vecteur contenant une séquence de nucléotides codant pour la protéine E2 de papillomavirus modifiée ou sauvage, ou vecteur selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, ou plasmide selon la revendication 12, ou plasmide pCGE2TR déposé à la C.N.C.M. le 29 janvier 1997 sous le numéro I-1838 pour l'utilisation comme médicament.

15 18. Séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, ou séquence de nucléotides codant pour une protéine E2TR ou séquence selon l'une des revendications 7 ou 8, pour l'utilisation comme médicament.

20 19. Protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, protéine E2TR ou protéine selon l'une des revendications 13 ou 14 pour l'utilisation comme médicament.

20. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 15 pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus.

25 21. Vecteur contenant une séquence de nucléotides codant pour la protéine E2 de papillomavirus modifiée ou sauvage, ou vecteur selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, ou plasmide selon la revendication 12, ou plasmide pCGE2TR déposé à la C.N.C.M. le 29 janvier 1997 sous le numéro I-1838 pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le
30 traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

22. Séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, ou séquence de nucléotides codant pour un protéine E2TR ou séquence selon l'une des revendications 7 ou 8, pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus.

23. Protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, ou protéine E2TR ou protéine selon l'une des revendications 13 ou 14 pour le traitement d'une infection à papillomavirus, et notamment pour le traitement d'un cancer associé à une infection à papillomavirus.

24. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 15 pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation thérapeutique contre une infection à papillomavirus, et notamment contre un cancer associé à une infection à papillomavirus.

25. Utilisation d'un vecteur contenant une séquence de nucléotides codant pour la protéine E2 de papillomavirus modifiée ou sauvage, ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, ou du plasmide selon la revendication 12, ou du plasmide pCGE2TR déposé à la C.N.C.M. le 29 janvier 1997 sous le numéro I-1838 pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation thérapeutique contre une infection à papillomavirus, et notamment contre un cancer associé à une infection à papillomavirus.

26. Utilisation d'une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, ou d'une séquence de nucléotides codant pour une protéine E2TR ou d'une séquence selon l'une des revendications 7 ou 8, pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation thérapeutique contre une infection à papillomavirus, et notamment contre un cancer associé à une infection à papillomavirus.

27. Utilisation d'une protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, ou d'une protéine E2TR ou d'une protéine selon l'une des revendications 13 ou 14 pour l'obtention d'un médicament destiné à une utilisation thérapeutique contre une infection à papillomavirus, et notamment contre un cancer associé à une infection à papillomavirus.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

28. Cellules transformées par un vecteur selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, ou par le plasmide selon la revendication 12.

29. Procédé de criblage de candidats dérivés de la protéine E2 capables d'induire une apoptose dans des cellules contenant la partie du génome d'un virus de type papillomavirus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

a) transfecter une cellule hôte en culture contenant la partie du génome d'un papillomavirus humain ou bovin correspondant aux gènes E6 et E7, cette partie du génome comprenant également la région du promoteur P_{105} , placée en amont des séquences codant pour les gènes E6 et E7, avec un vecteur, en particulier un adénovirus recombinant ou un plasmide, contenant une séquence nucléique codant pour un candidat dérivé de la protéine E2 à tester placée sous le contrôle d'éléments permettant son expression dans la cellule hôte, et

b) mesurer le degré de mortalité cellulaire dans la culture des cellules hôtes transfectées.

30. Utilisation d'une protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, ou d'une séquence de nucléotide codant pour une telle protéine, pour la préparation d'une composition destinée à induire l'apoptose cellulaire.

31. Utilisation d'une protéine E2 de papillomavirus, modifiée ou sauvage, ou d'une séquence de nucléotide codant pour une telle protéine, pour la préparation d'une composition destinée à augmenter l'activité de la protéine p53.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

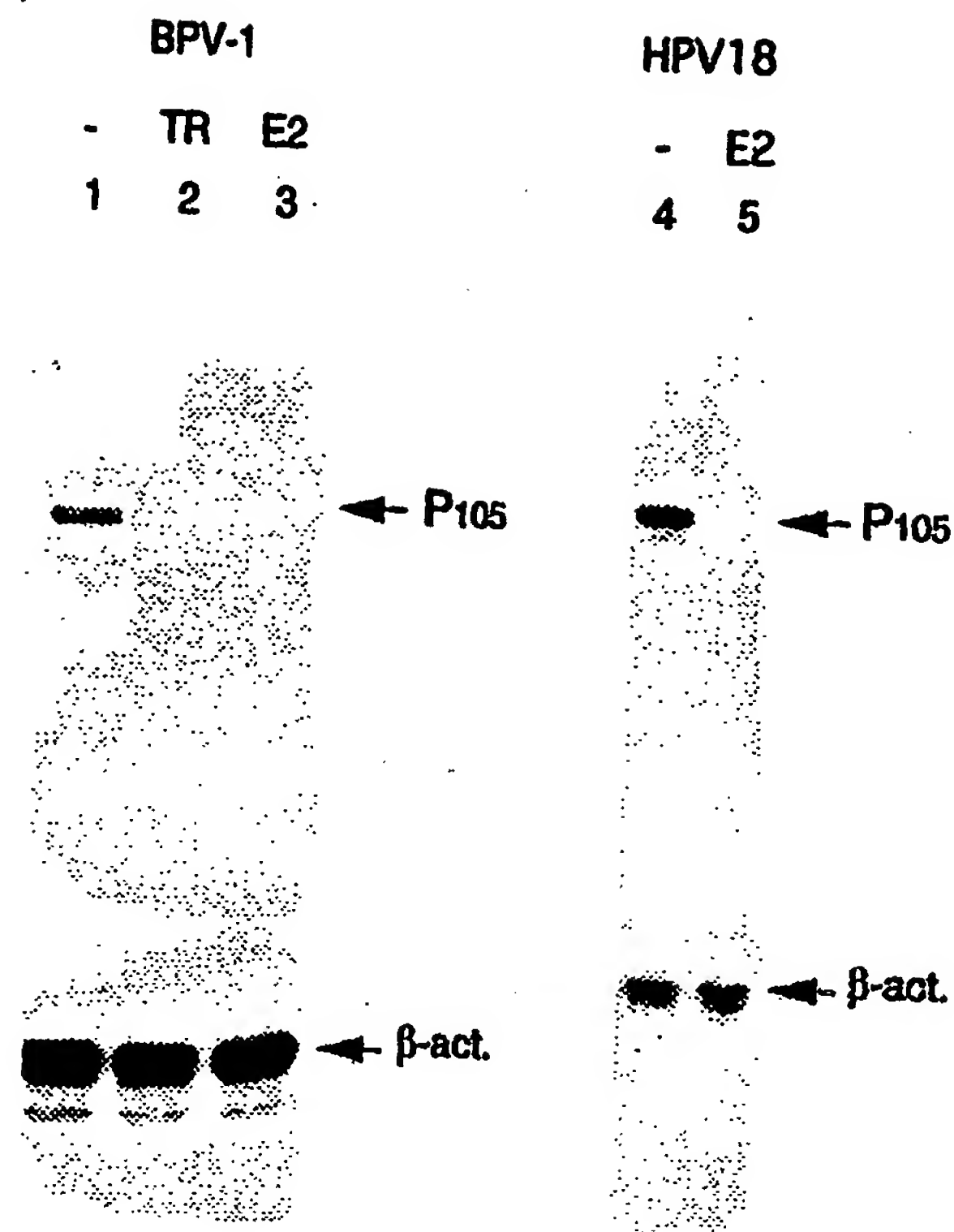


FIGURE 1A

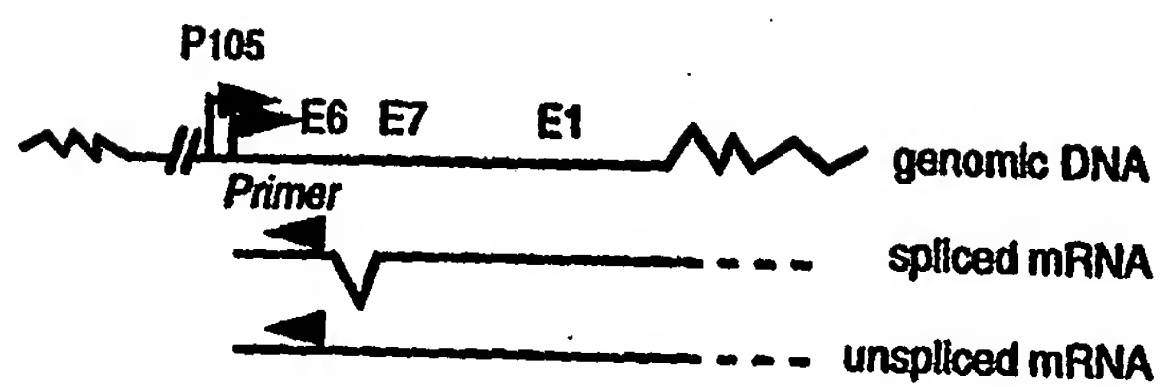


FIGURE 1B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

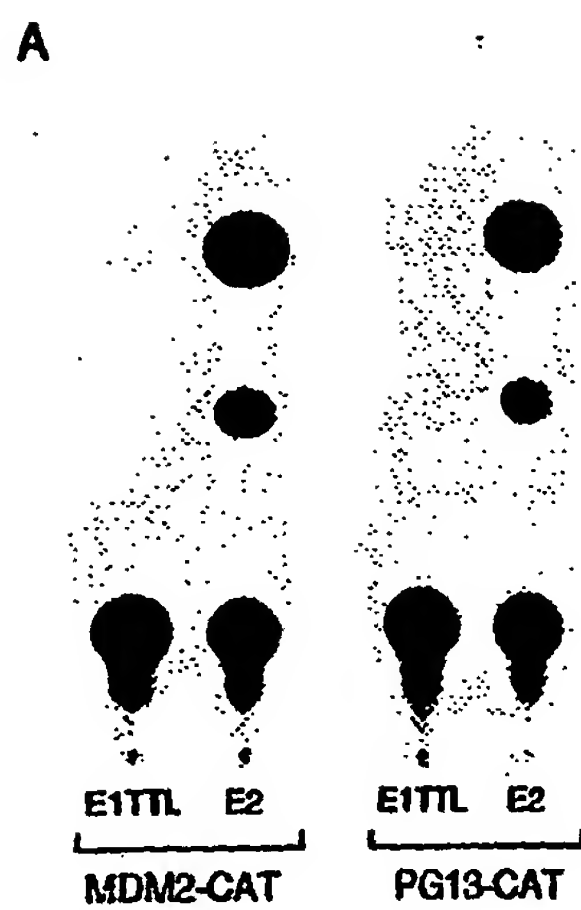


FIGURE 2A

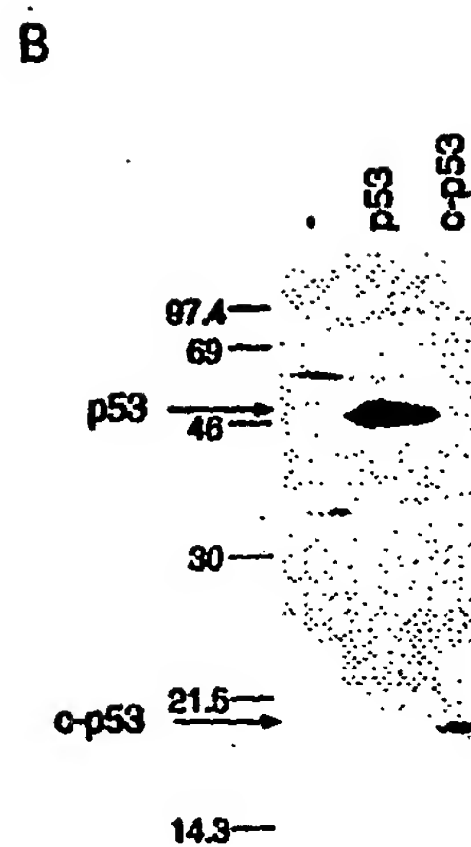


FIGURE 2B

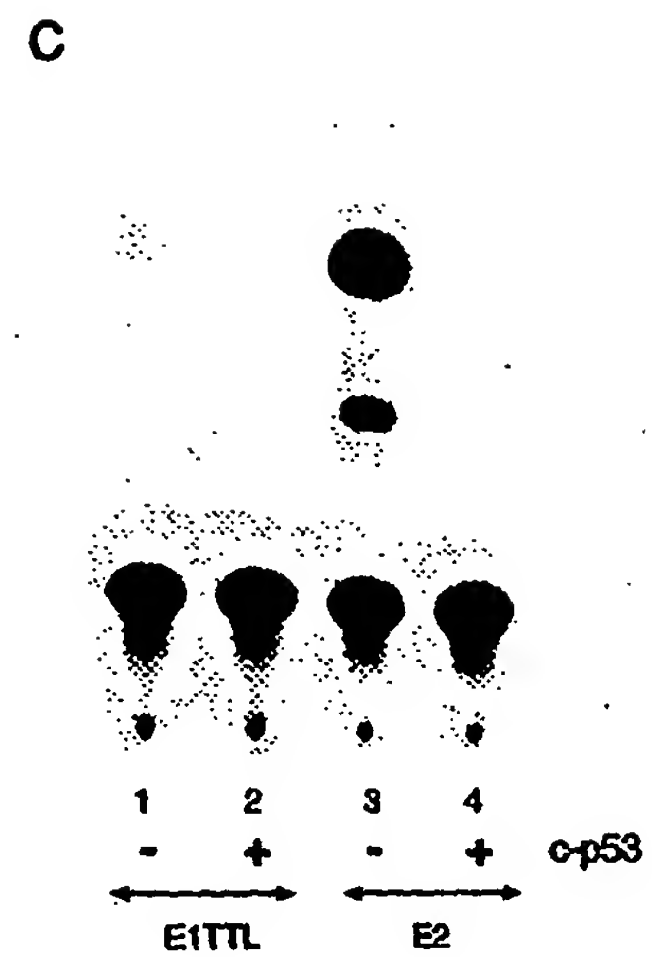


FIGURE 2C

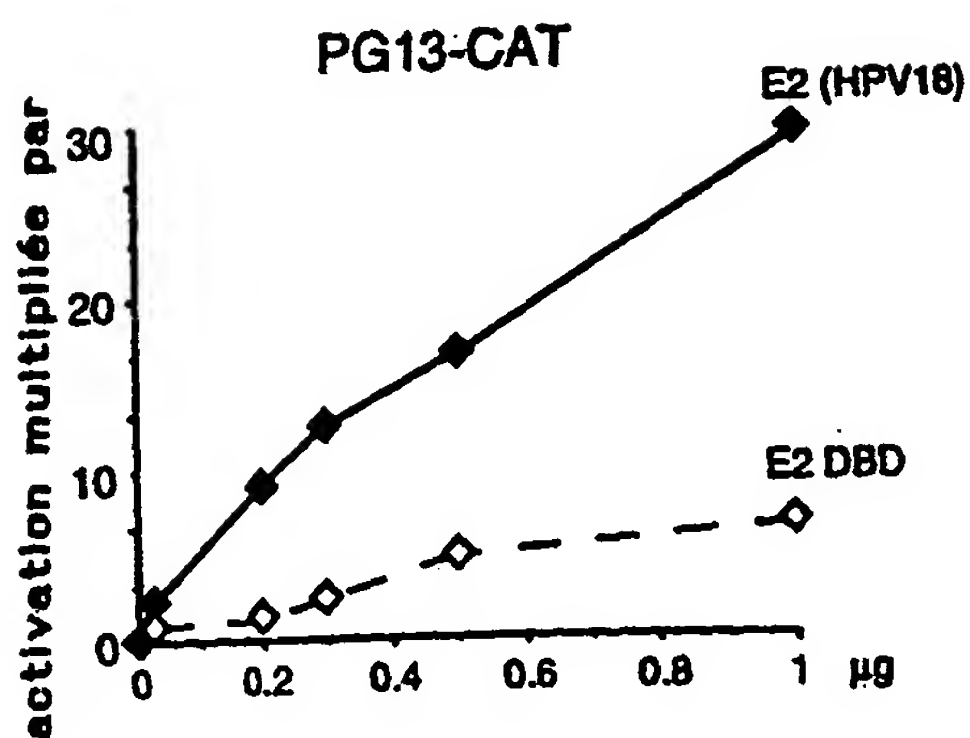


FIGURE 3A

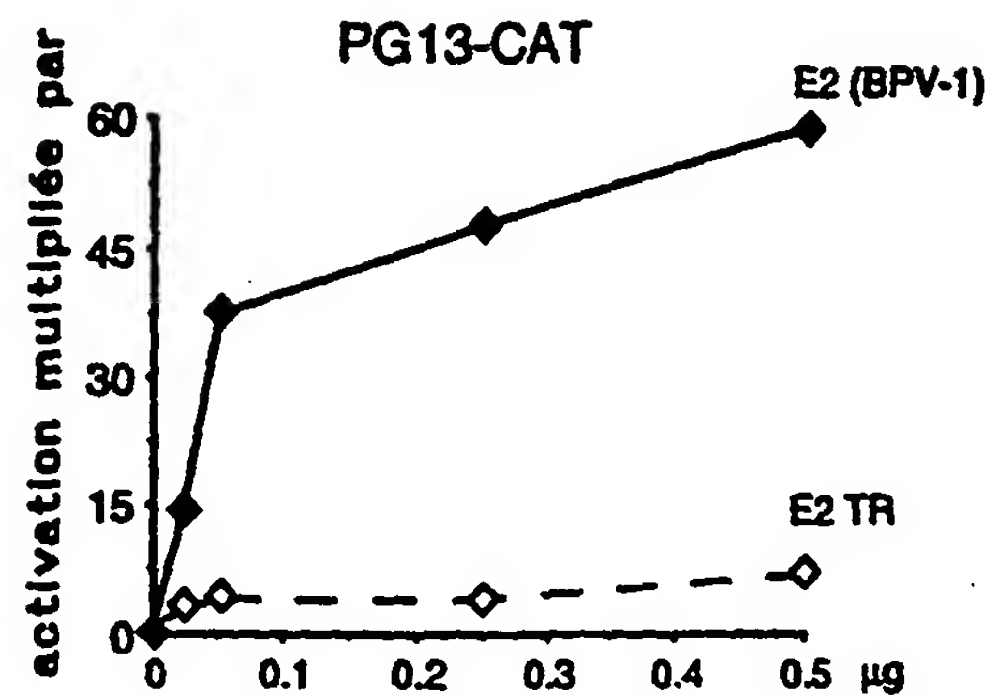


FIGURE 3B

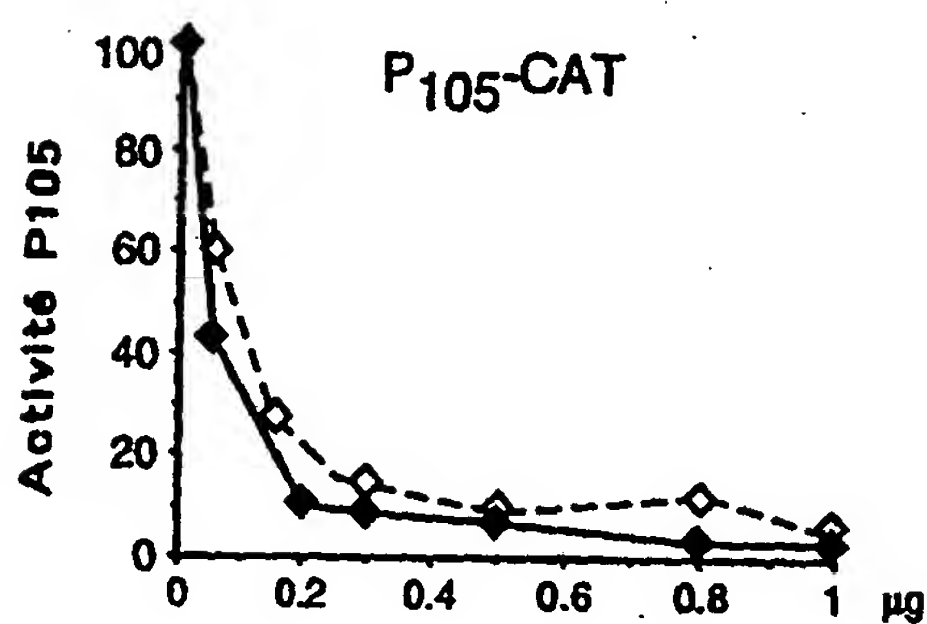


FIGURE 3C

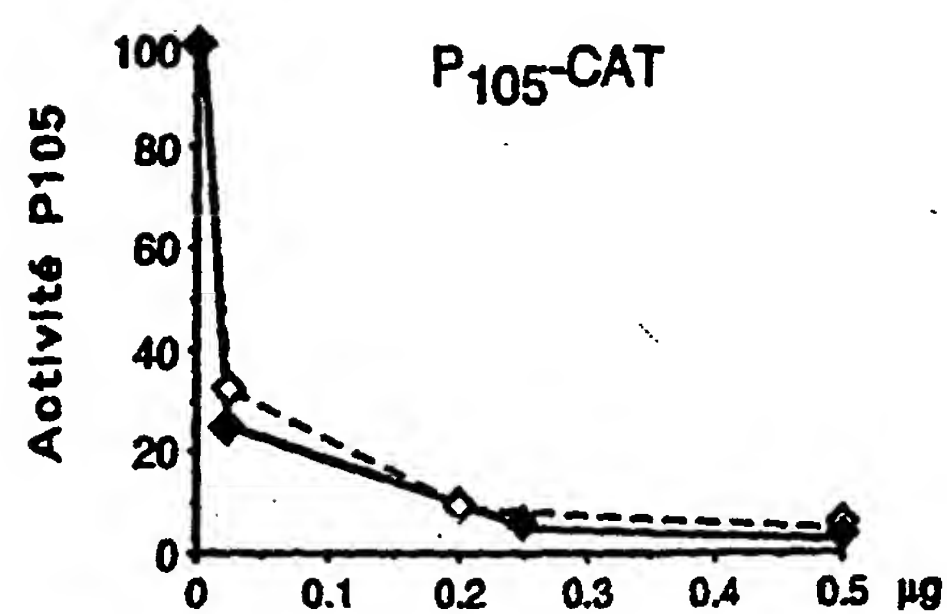


FIGURE 3D

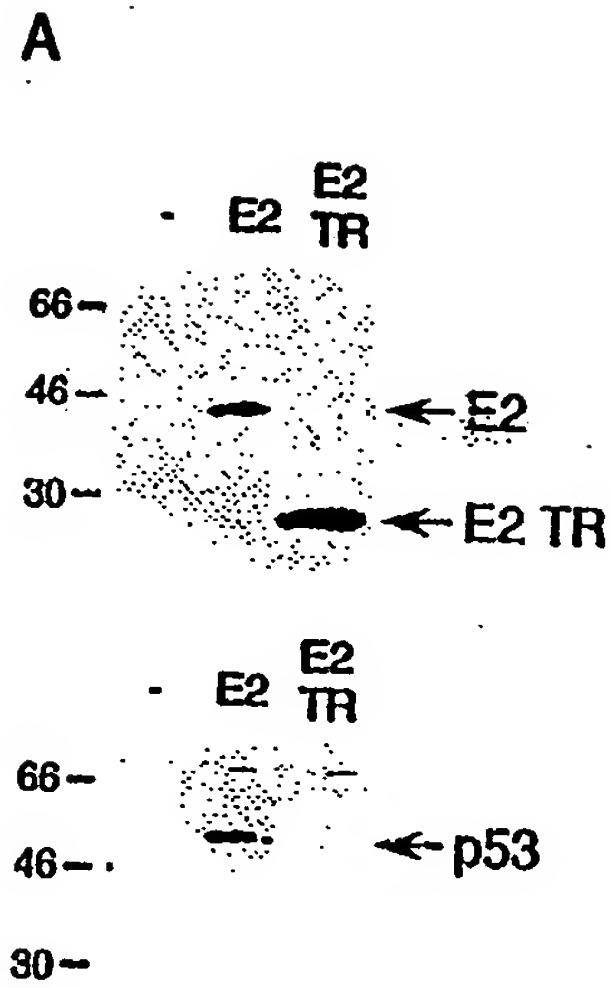


FIGURE 4A

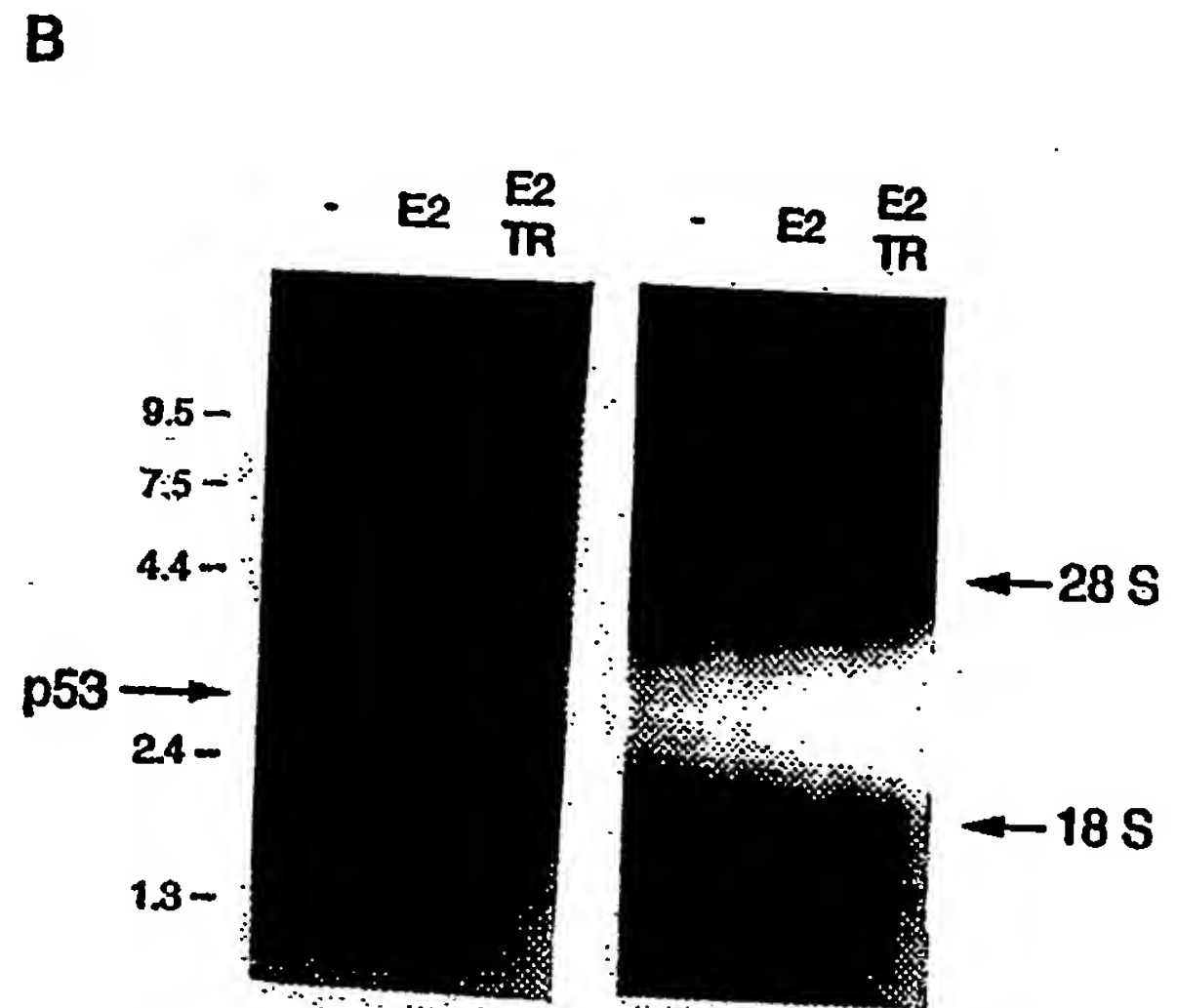


FIGURE 4B

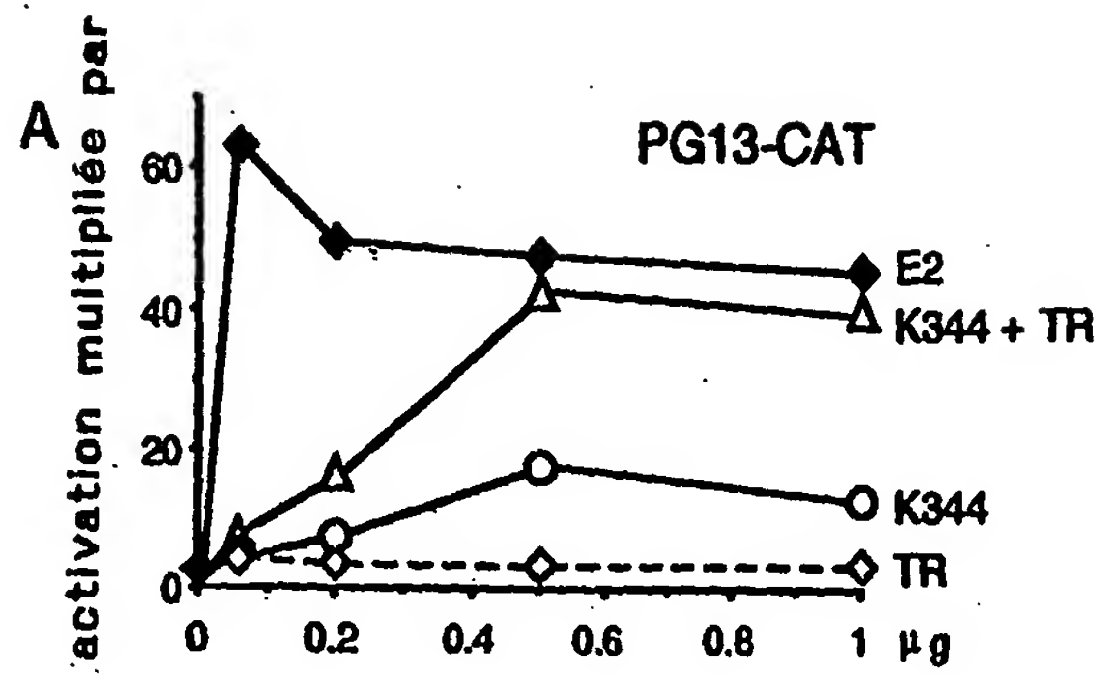


FIGURE 5A

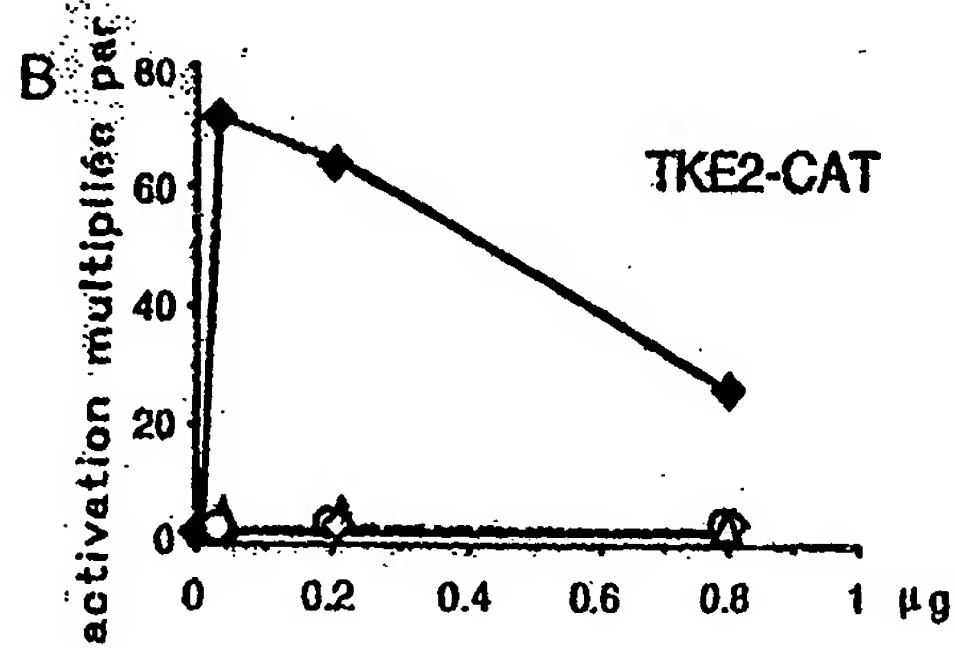


FIGURE 5B

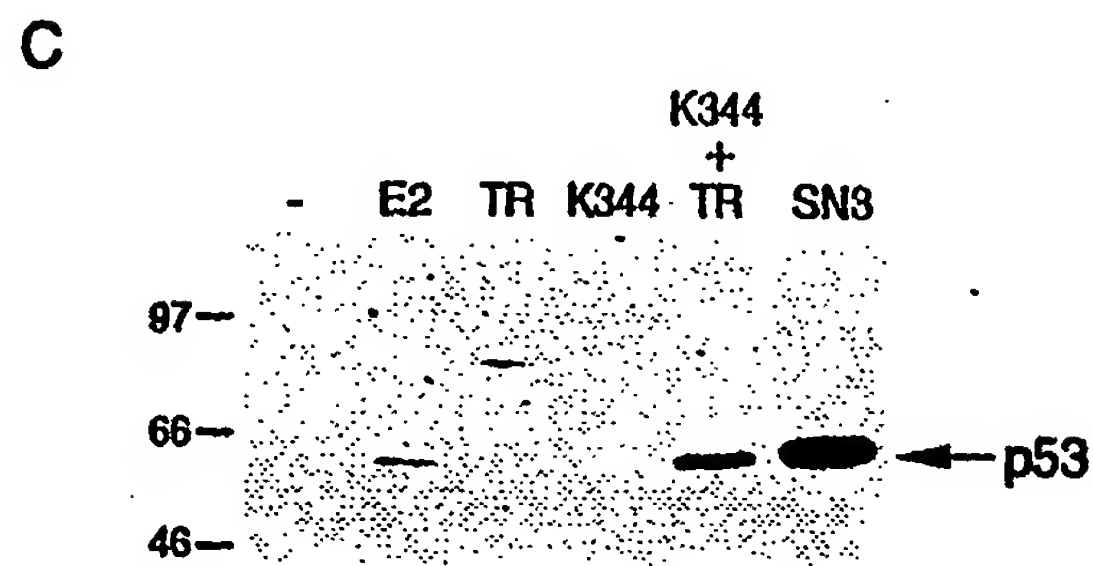


FIGURE 5C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

- 6/43 -

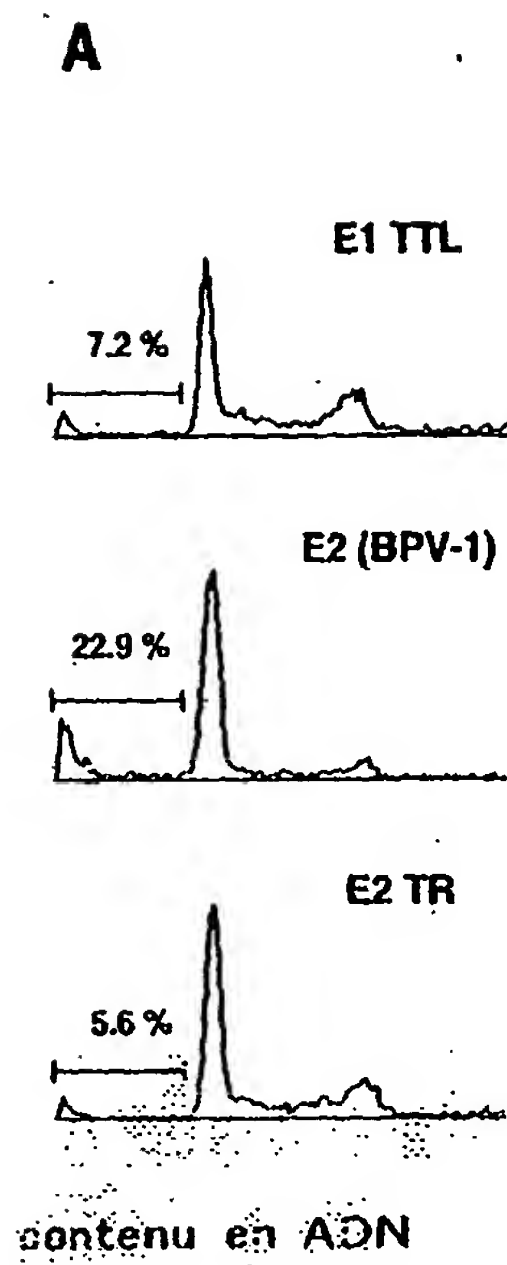


FIGURE 6A

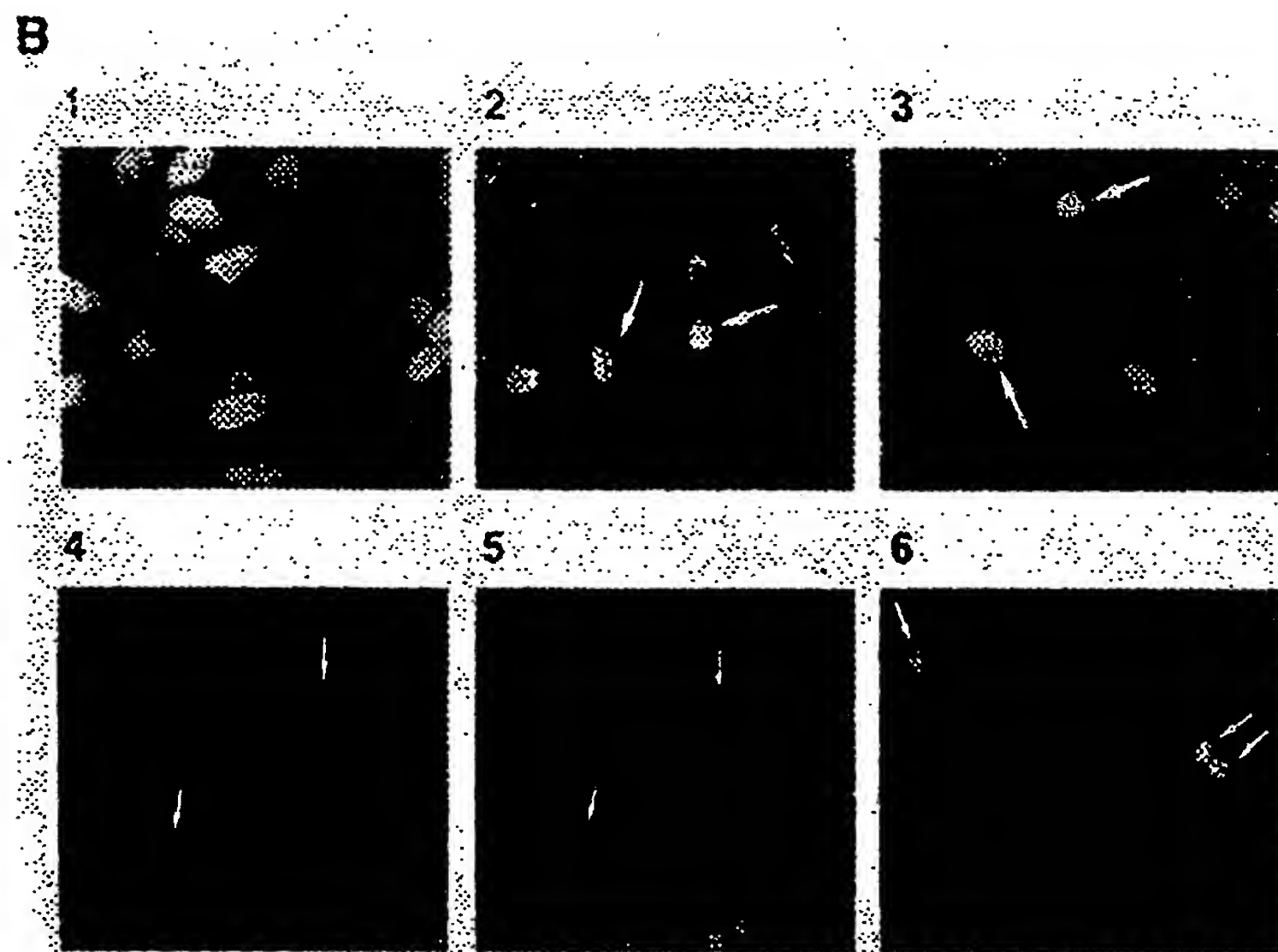


FIGURE 6B

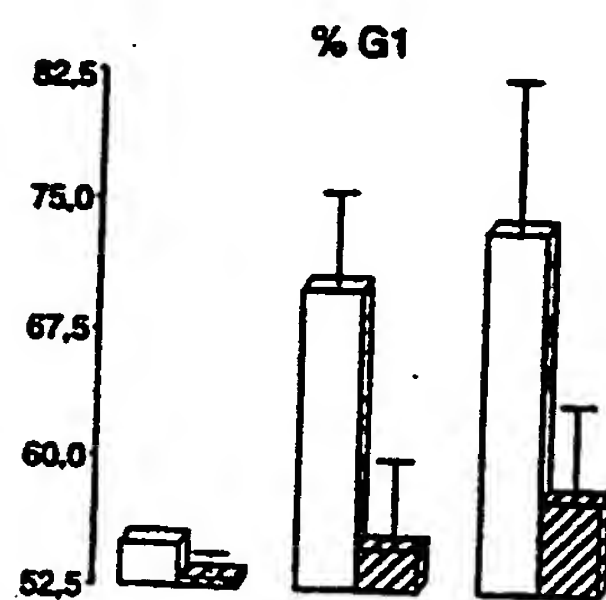


FIGURE 7A

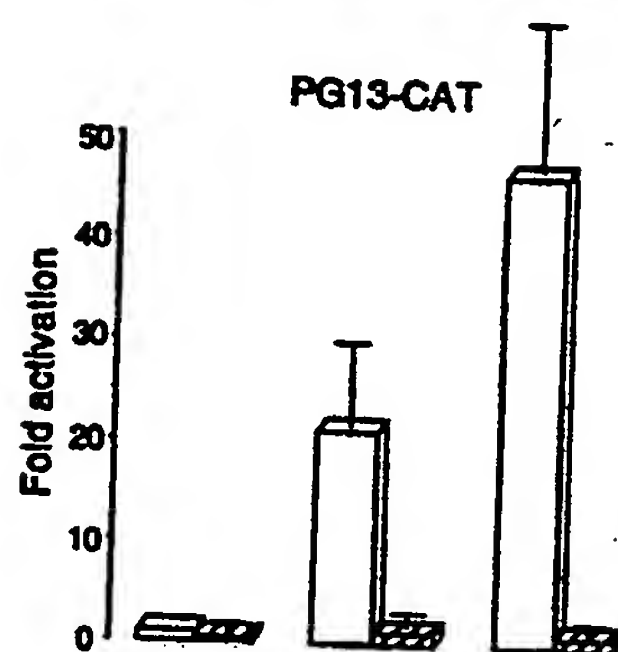


FIGURE 7B

% de sous-population 2N

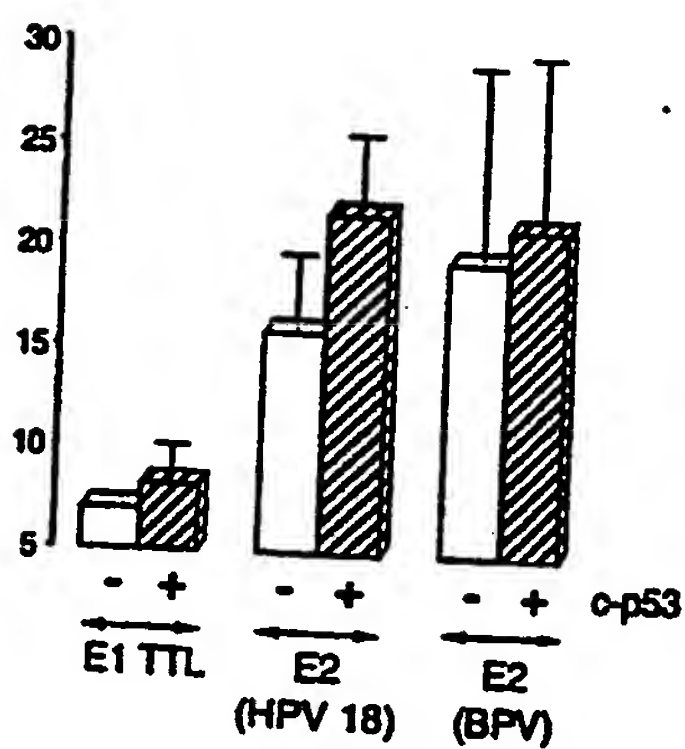


FIGURE 7C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

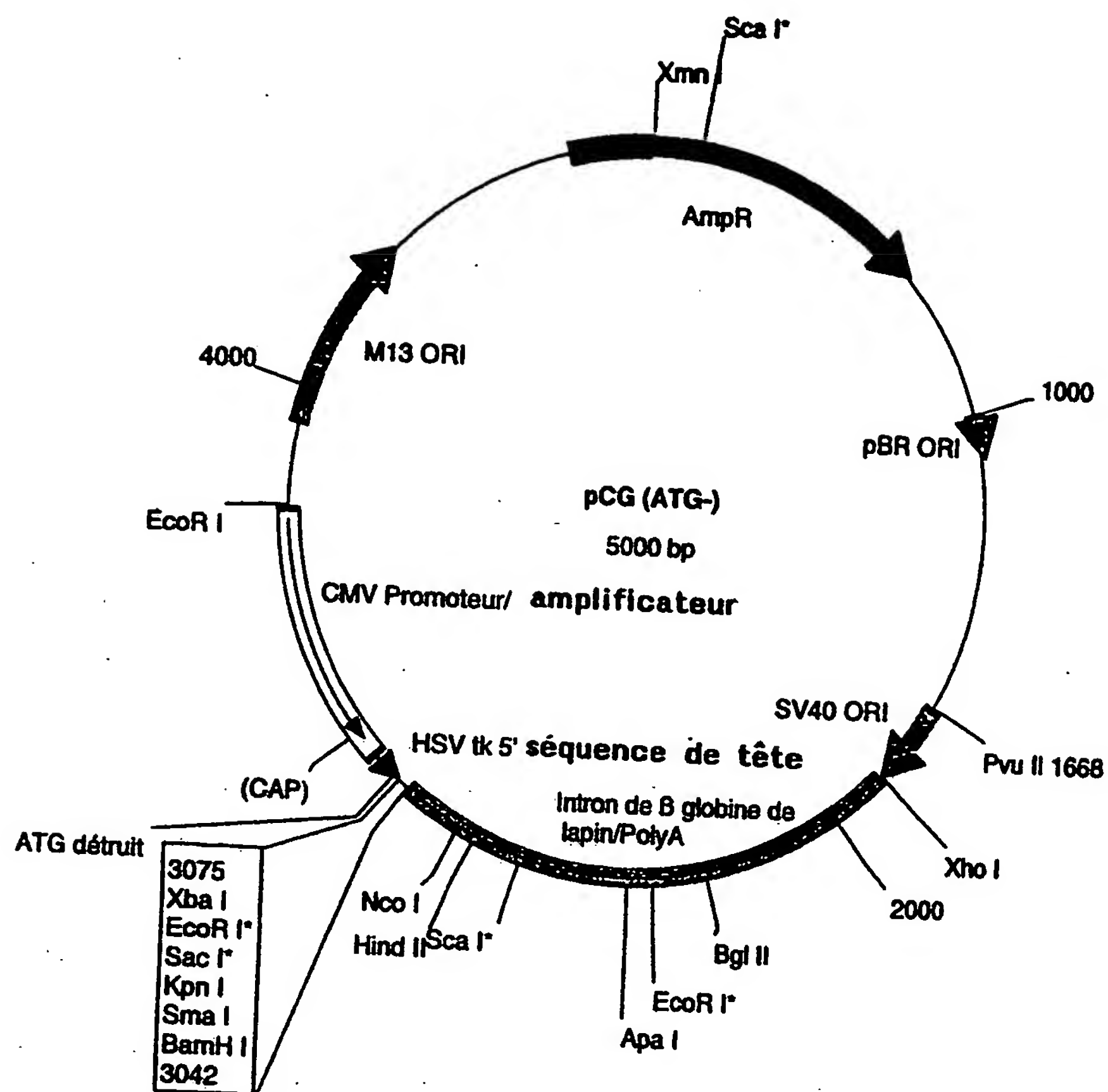


FIGURE 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



ISDOCID: <WO__9832861A1_L>

- 10/43 -

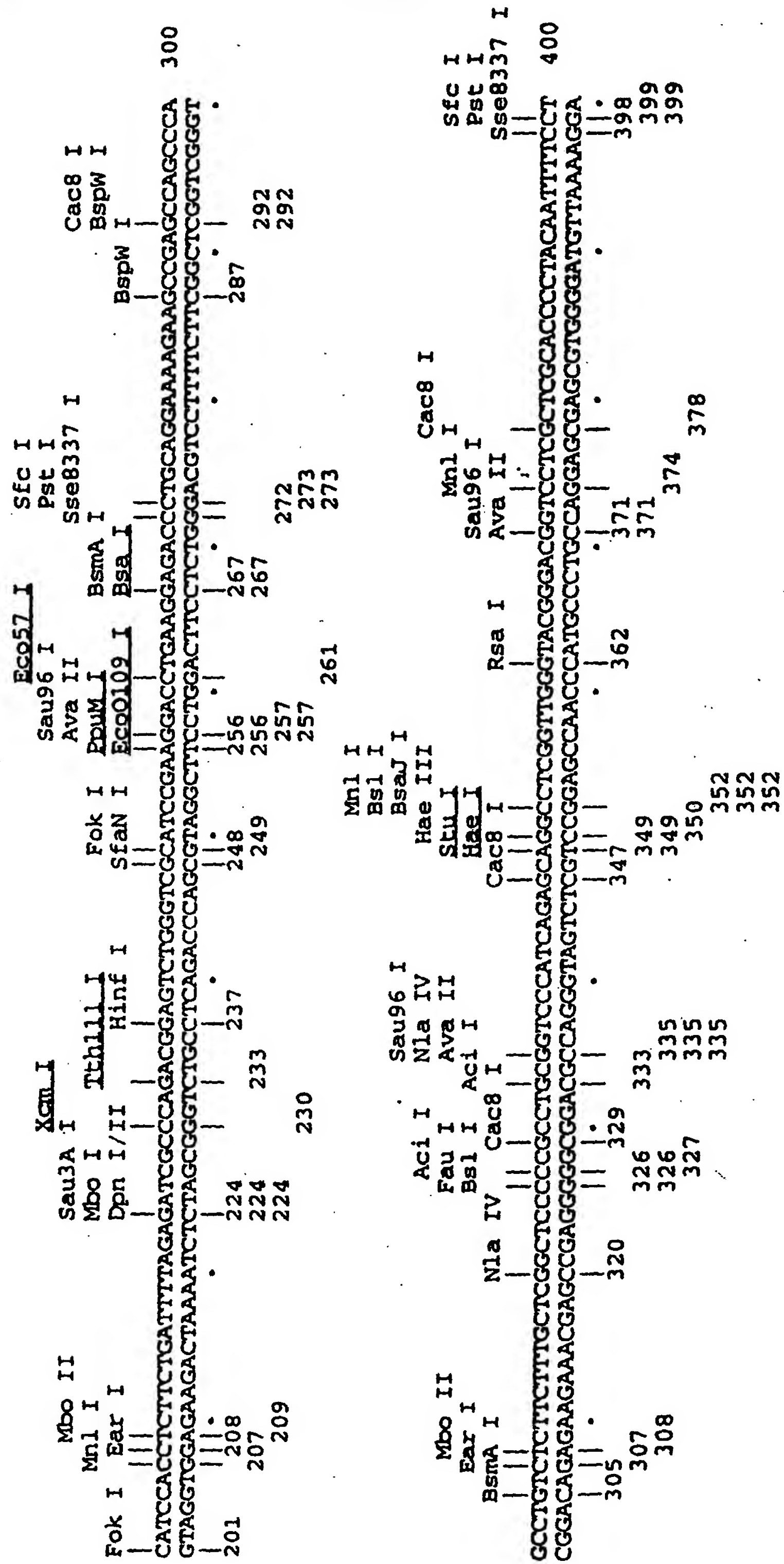


FIGURE 9A/2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

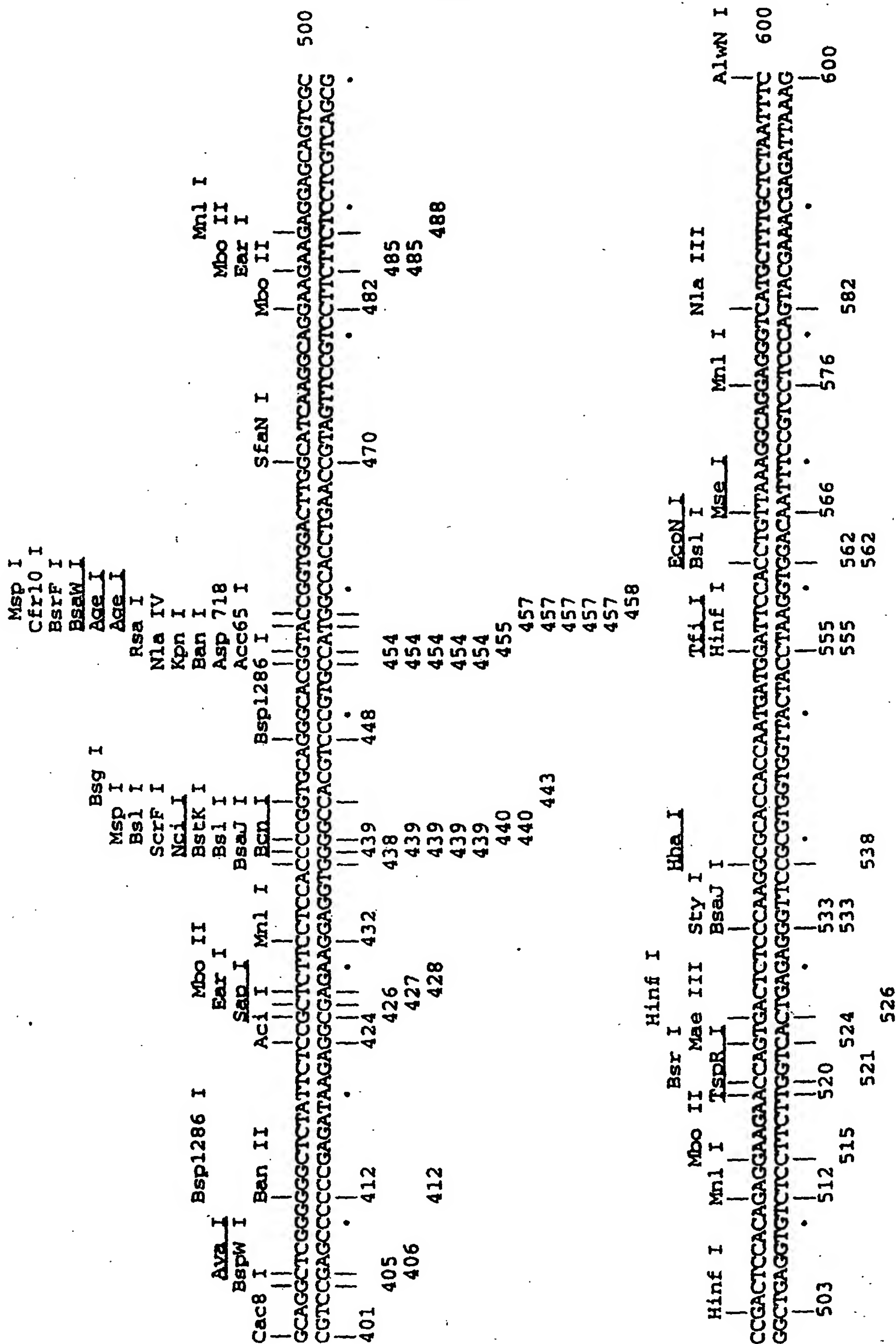


FIGURE 9B/1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

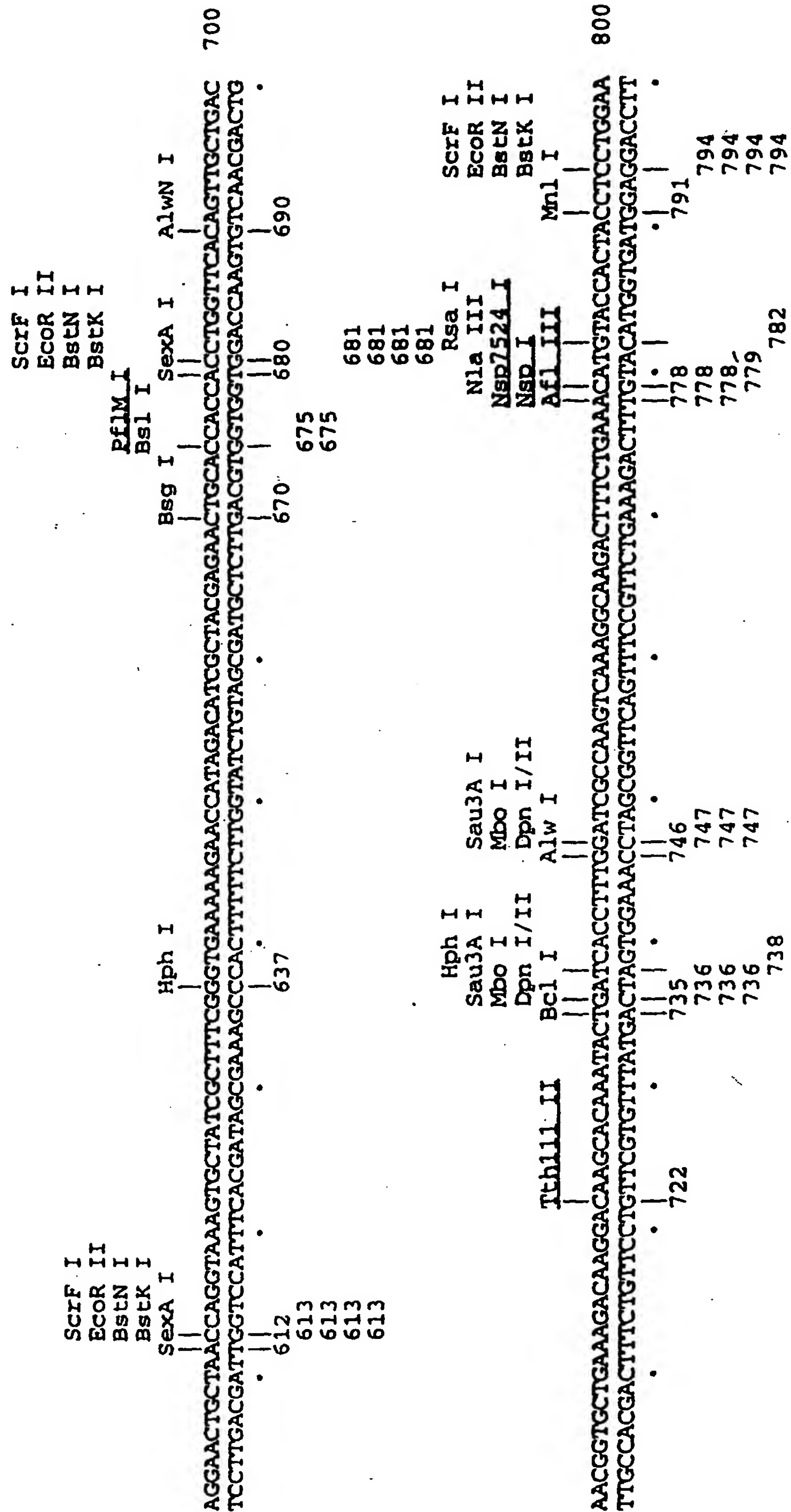


FIGURE 9B/2
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

14/43

1/1 TCT AGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG CAC AGA GGA GGA CTG GCA GCT TGC CAA GGC TGG GGC TGA CGG AAC TGG GCT CTA CTA CTG CAC CAT
S R I R A R A R Y P H R G R G R L A A C Q G W G * R N W A L L L L H H
L E F E L G T R T E D G W Q L A K A G A D G T G L Y Y C T M
* N S S S V P A Q R T A G S L P R L G L T E L G S T T A P W
91/31 31/11 61/21 151/51
GGC CGG TGC TGG AGC CAT TTA CTA TTC TCG CTT TGG TGA CGA GGC AGC ATT TAG TAC AAC AGG GCA TTA CTC TGT AAG AGA TCA GGA
G R C W T H L L Y Y S R F G D E A A R F S T T G H Y S V R D Q D
A G A G R I Y Y S R F G D E A A R F S T T G H Y S V R D Q D
P V L D A F T I L A L V T R Q P D L V Q Q G I T L * E I R T
181/61 211/71 241/81
CAG AGT GTA TGC TGG TGT CTC ATC CAC CTC TTC TGA TTT TAG AGA TCG CCC AGA CGG AGT CCG ATC CGA AGG ACC TGA AGG AGA
Q S V C W C L I H L F * F * R S P R R S L G R I R R T * R R
R V Y A G V S S T S S D F R D R P D G V W V A S E G P E G D T
E C M L V S H P P L L I L E I A Q T E S G S H P K D L K E T
271/91 301/101 331/111
CCC TGC AGG AAA AGA AGC CGA GCC AGC CCA GCC TGT CTC TTC TTT GCT CGG CTC CCC CGC TCC CAT CAG AGC AGG CCT CGG TTG
P C R K R S R A S P A C L F F A R L P R L R S H Q S R P R L
P A G K E A E P A Q P V S S L L C S A P P A V P P S E Q A S V G
L Q E K K P S Q P S L S L L C S A P P A V P P S E Q A S V G
361/121 391/131 421/141
GGT ACG GGA CGG TCC TCG CTC GCA CCC CTA CAA TTT TCC TGC AGG CTC GGG GGG CTC TAT TCT CCG CTC TTC CTC CAC CCC GGT GCA GGG
T G R S S L A P L Q F S C R L G G L Y S P L F L H P G A G
V R D G P R S H P Y N F P A G S G G S I L R S S S T P P R C R A
Y G T V L A R T P I F L Q A R G A L F S A L P P R C R A

FIGURE 10/1

451/151 CAC GGT ACC GGT GGA CTT GGC ATC AAG GCA AGA GGA GCA GTC GCC CGA CTC CAC AGA GGA AGA ACC AGT GAC TCT CCC AAG GCG
H G T G G L G I K A G R G A V A R L H R G R T S D S P K A
T V P V D L A S R Q E E E Q S P D S T E E E P V T L P R R
R Y R W T W H Q G R K K R S S R P T P Q R K N Q * L S Q G A

511/171
541/181 CAC CAC CAA TGA TGG ATT CCA CCT GTT AAA GGC AGG AGG GTC ATG CTT TGC TCT AAT TTC AGG AAC TGC TAA CCA GGT AAA GTG CTA TCG
H H Q * W I P V K G R R V M L C S N F R N C * P G K V L S
T T N D G F H L L K A G G S C F A L I S G T A N Q V K C Y R
P P M M D S T C * R Q E G H A L L * F Q E L L T R * S A I A

601/201
631/211 CTT TCG GGT GAA AAA GAA CCA TAG ACA TCG CTA CGA GAA CTG CAC CAC CAC CTG GTT CAC AGT TGC TGA CAA CGG TGC TGA AAG ACA AGG
L S G E K E P * T S L R E L H H L V H S C * Q R C * K T R
F R V K K N H R H I D I A T R T A P P P G S Q L L T T V A D N G A E R Q G D
F G * K R T I A T R T A P P P G S Q L L T T V L K D K D

751/251
721/241 ACA AGC ACA AAT ACT GAT CAC CTT TGG ATC GCC AAG TCA AAG GCA AGA CTT TCT GAA ACA TGT ACC ACT ACC TCC TGG AAT GAA CAT TTC
T S T N T D H L W I A K S Q R Q D F L K H V P L P P G M N I S
Q A Q I L I T F G S P S Q R Q K T F * N M Y H Y L L E * T F P

841/281
811/271 CGG CTT TAC AGC CAG CTT GGA CTT CTG ATC ACT GCC ATT GCC TTT TCT TCA TCT GAC TGG TGT ACT ATG CCA AGG GGA TCC
R L Y S Q L G L I T A I A F S S S D W C T M P R G S
G F T A S L D F * S L P L P F L H L T G V L C Q G D
A L Q P A W T S D H C L F F I * L V Y Y A K G I

871/291

15/43

FIGURE 10/2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

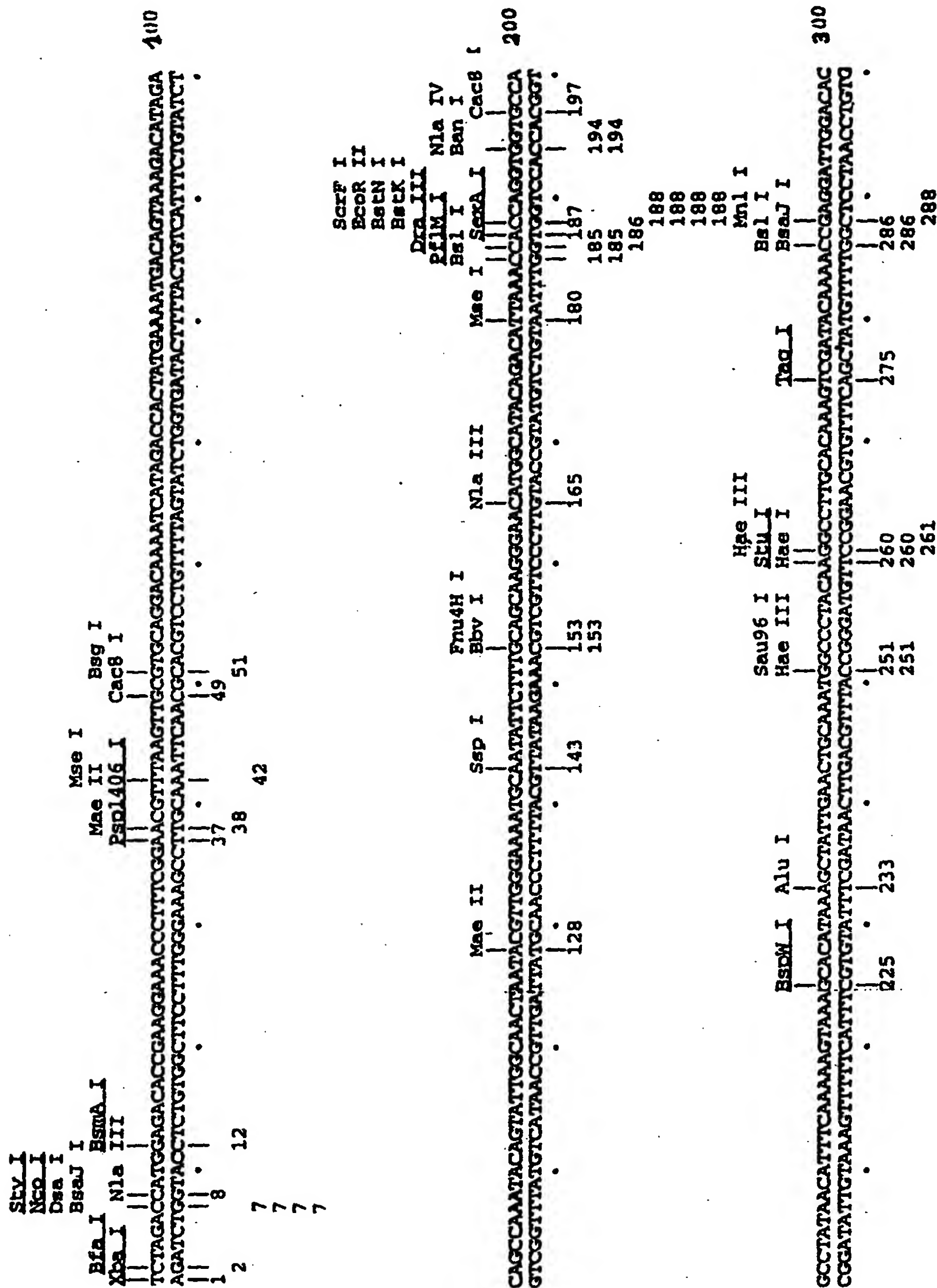


FIGURE 11A/1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

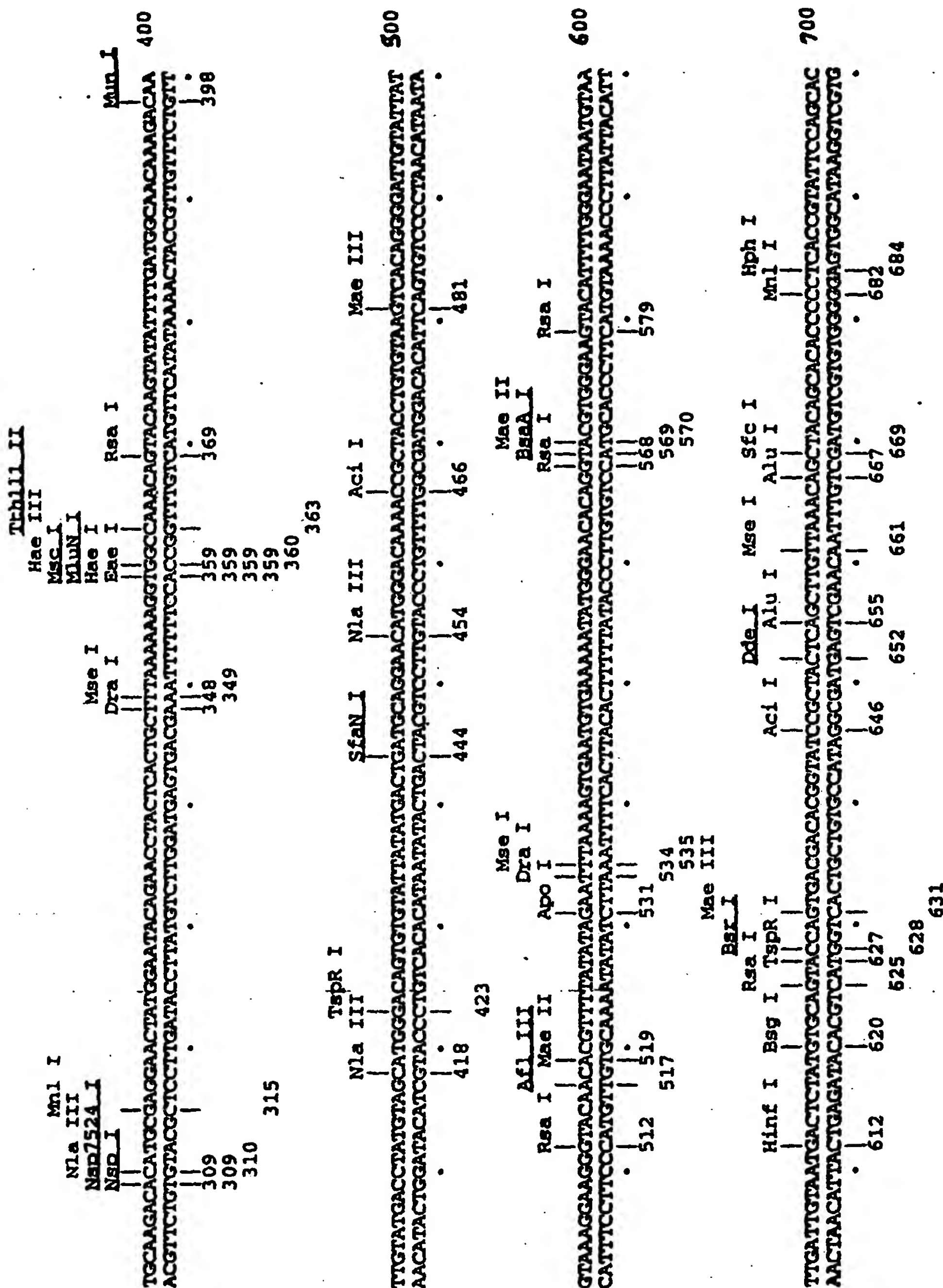


FIGURE 11A/2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

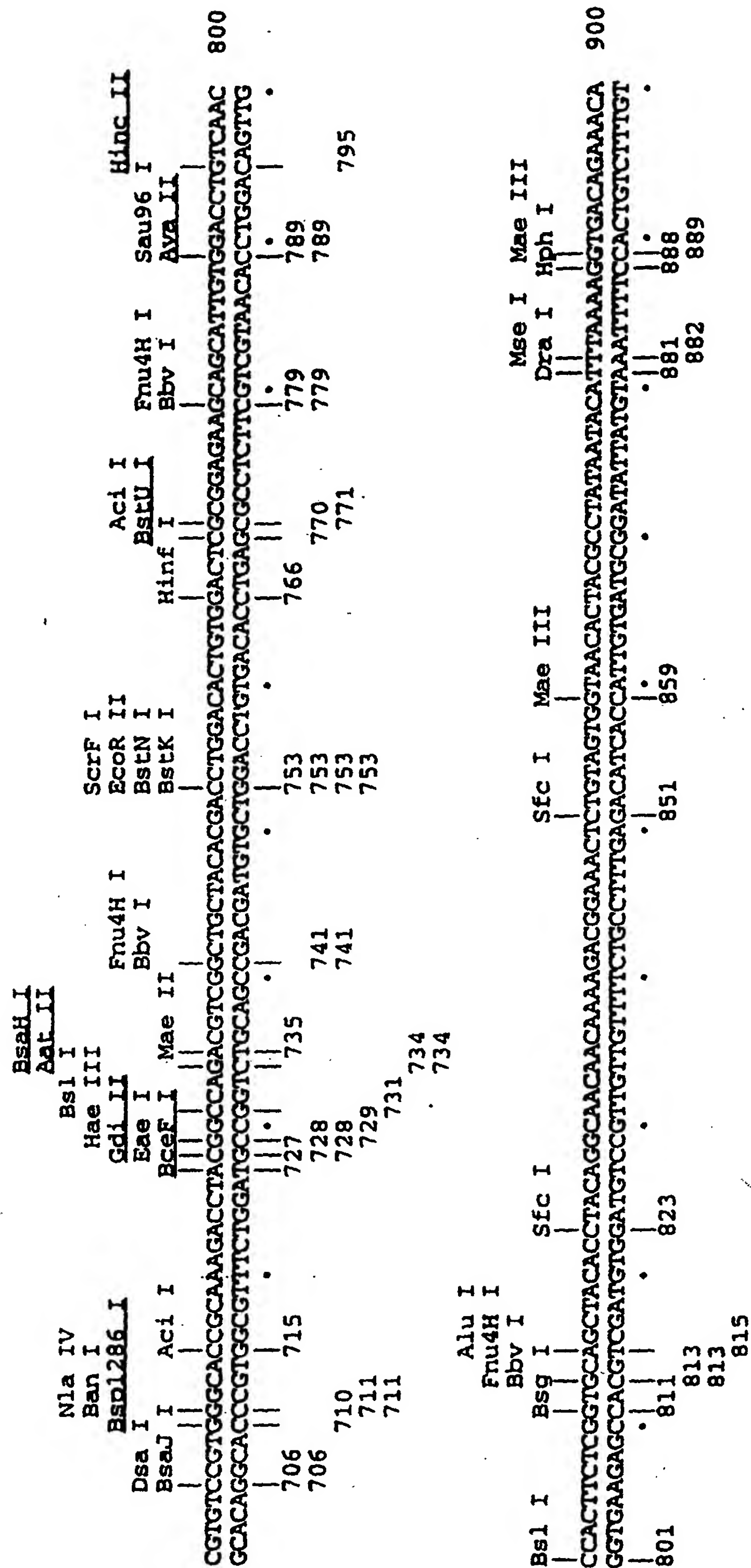


FIGURE 11B/1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

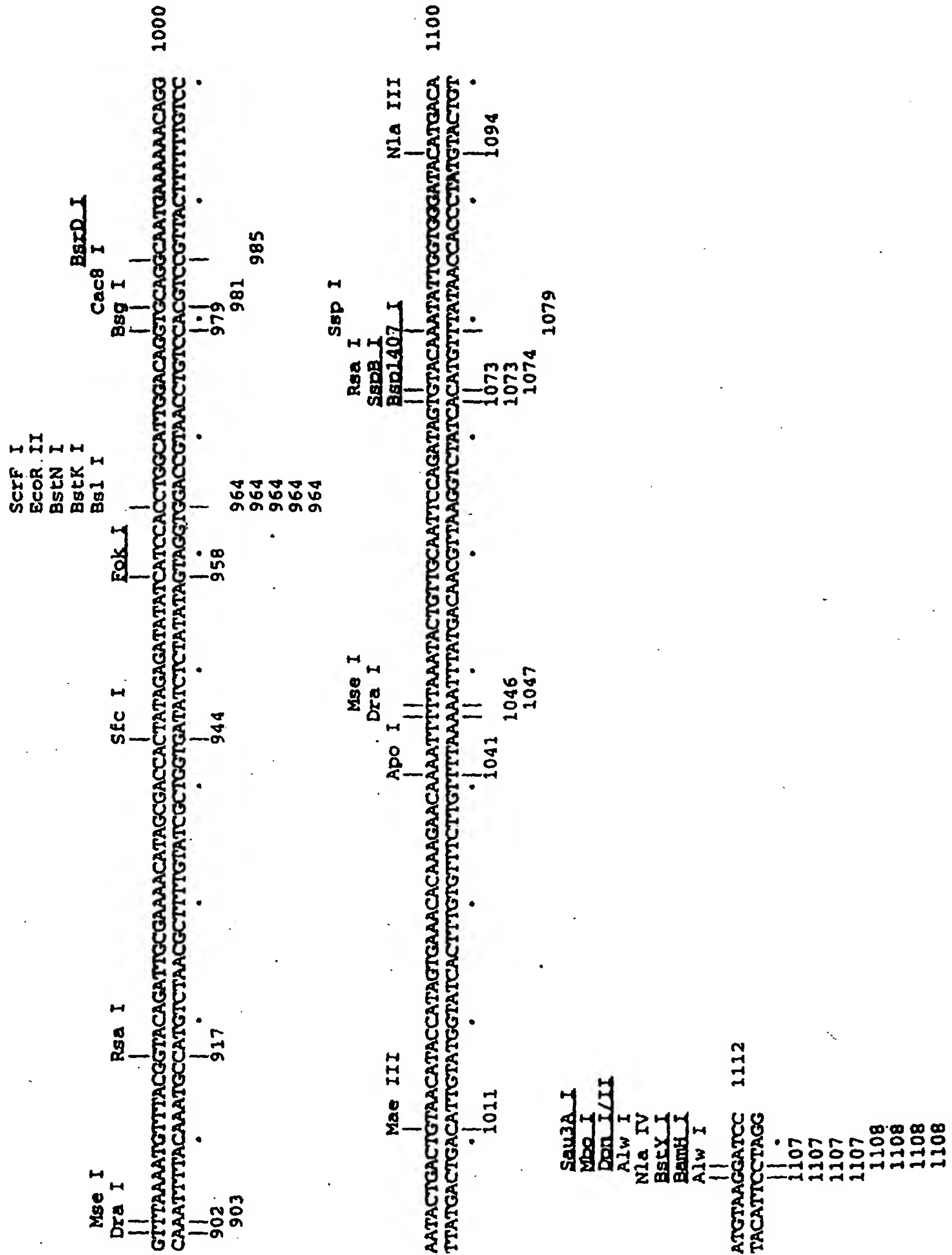


FIGURE 11B/2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

1/1 TCT AGA CCA TGG AGA CAC CGA AGG AAA CCC TTT CCG AAC GTT TAA GTT GCG TGC AGG ACA AAA TCA TAG ACC ACT ATG AAA ATG ACA GTA
S R P W R H R R R K P F R N V V A C R A G Q N H R P L T M K M T V
L D H G D T P K E T L S E R L S C V Q D K I I D H Y E N D S K
91/31 AAG ACA TAG ACA GCC AAA TAC AGT ATT GGC AAC TAA TAC GTT GGG AAA ATG CAA TAT TCT TTG CAG CAA GGG AAC ATG GCA TAC AGA CAT
K T T A K Y S I G N T N T L I R W E N A I F A A R E H Q I Q T L
R H R Q P N T V L A T N T L I R W E N A I F A A R E H Q I Q T L
181/61 TAA ACC ACC AGG TGG TGC CAG CCT ATA ACA TTT CAA AAA GTA AAG CAC ATA AAG CTA TTG AAC TGC AAA TGG CCC TAC AAG GTC TTT CAG
D I D S Q I Q Y W Q L I R W E N A I F A A R E H Q I Q T L
K T P R G G A S L H F K K S T I K L L N C T V C V Y M T D A G
271/91 S R Y K T E D A X H F K K Q R Q L Y D L C S M G Q C V L Y D T D A G
361/121 GCC AAA CAG TAC AAG TAT ATT TTG ATG GCA AAG ACA ATT GTA TGA CCT ATG TGA L N C T V C V Y M T D A G
Q Y K Y I L M A T K T I V P M H G T V C V Y M T D A G
451/151 GAA CAT GGG ACA AAA CCG CTA OCT GTG TAA GTC ACA GGG GAT TGT ATT ATG TAA AAG AAG GGT ACA ACA CGT TTT ATA TAG NAT TTA AAA
E H G T K P L P V V T G D C I M R K G T T R F I N L K
N M G Q N R Y L C K S Q G I V L C K G R V Q H V L Y R I E F K S
T W D K T A T C V S H R G L Y Y V K E G Y N T F Y I E F K S

BNSDOCID: <WO_8832881A1.J>

FIGURE 1
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REG 6)

541/181 GTG AAT GTG AAA AAT ATG GGA ACA CAG GTA CCG GTG GGG AAG TAC ATT TTG GGA ATA ATG TAA TTG ATT GTA ATG ACT CTA TGT GCA GTA CCA
V N V K N M G T Q V R G K Y I L G I M C N L I V M T L C A V P
* M * K I W E H R Y V G S T F W E * C N * L * L Y V Q Y Q
E C E K Y G T W E V H F G N N V I D C N D S M C S T S
631/211 GTG ACG ACA CCG TAT CCG CTA CTC AGC TTG TTA AAC AGC TAC AGC ACA CCC CCT CAC CGT ATT CCA GCA CCG TGT CCG TGG GCA CCG CAA
V T R Y P L S L L N S Y S T P P H R I P A P C P W A P Q
* R H G I R Y S A C * T A T A H P L T V F Q H R V R G H R K
D D T V S A T Q L V K Q L Q H T P S P Y S S T V S V G T A K
721/241 AGA CCT ACG GCC AGA CGT CCG CTG CAC CTA CAG CTA CAC CTA CCG GTG GAC TCG CGG AGA AGC AGC ATT GTG GAC CTG TCA ACC CAC TTC TCG
R P T A R R R L L H D L D T V D S R S I V D L S T H F S
D L R P D V G C Y T T W T L W T R G E A A L W T C Q P T S R
T Y G Q T S A A T R P G H C G L A E K Q H C G P V N P L L G
811/271 GTG CAG CTA CAC CTA CAG GCA ACA ACA AAA GAC GGA AAC TCT GTA GTG GTA ACA CTA CGC CTA TAA TAC ATT TAA AAG GTG ACA GAA ACA
V Q L H L Q A T T K D G N S V V V * W * H Y A Y N T F K R * Q K Q
C S Y T Y R Q Q K T E T L C S G N T P I I H L K G D R N S
A A T P T G N N K R R K L C S G N T T P I I H L K G D R N S
901/301 GTT TAA AAT GTT TAC GGT ACA GAT TGC GAA AAC ATA GCG ACC ACT ATA GAG ATA TAT CAT CCA CCT GGC ATT GGA CAG GTG CAG GCA ATG
V * N V Y G T D C E N I A T T I E I Y H P P G I G Q V Q A M
F K M F T V Q I A K T * R P L * R Y I I H L A L D R C R Q *
L K C L R Y R L R K H S D H Y R D I S T W H W T G A G N E
991/331 AAA AAA CAG GAA TAC TGA CTG TAA CAT ACC ATA GTG AAA CAC AAA GAA CAA AAT TTT TAA ATA CTG TTG CAA TTC CAG ATA GTG TAC AAA
K K Q E Y * L * H T I V K H K E Q N F * I L L Q F Q I V Y K
K N R N T D C N I P * N T K N K I F K N T V A I P D S V Q I
1081/361 TAT TCG TCG GAT ACA TGA CAA TGT AAG GAT CC
Y W W D T * Q C K D
I G G I H D N V R I
L V G Y M T M * G S

FIGURE 12/2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

- 22/43 -

<- fin de E1 dans HPV16, HPV31 et RbPV1

<- fin de E1 dans HPV52, HPV35, HPV35h, HPV33, et HPV58

GROUPA.con	MOEt1sqRLnvcQdXIL?bYE?DsdL?dbI?yVKLiRlECa??YkArenGi?hlnHQVVP?la?	56
HPV31	-----E--N--KR-C--D--H--VLM-----HSI-----A-SV	64
HPV52	--SIPA--AV-E--DL--A--N--NAQ-EH--T-M-VLF--K-L-T-IG--PM-V	64
HPV35	-----S-----E--T--C-S--Q-----VF-----KT-----TQ-I	65
HPV35h	-----S-----E--T--C-S--Q-----VF-----KT-----TQ-I	65
HPV16	-----C-----T--N-----R--D--HM-----IY-----FK-I-----T--V	64
HPV33	--EI-A--AV-E--DL--A--K--PSQ-EH--N--LL-T-KQ--FS--C--S-LA	64
HPV58	--EI-A--SAV-----DI--A--KH--TSQ-EH--N--IM-T-Q--S--C--S-VA	64
RbPV1	--A-AE--SAL--R--EL--A--K--K-Q-EH--CV-Q--VL-----V-FS-----S-TV	65

<- fin de E1

GROUPB.con	MOE?iaXrLdACQ?qlLELYEensid1bkHi?HWKc?RIEaVILbKA?qMGLahiglQvVPpLtV	60
HPV6b	--A-----E-----T-----VL--N-H-----Y--K-----M-----K--	64
HPV11	--A-----D-----I-----N--I-----K-----	64
HPV13	--T--H-----E-----NE-K--Q--L-Y-----R-----	64
PCPV1	--TL--H-----E-----NE-T--Q--V-H-N--Y--R-----K--	64
HPV34	--TLC--S--DAI-----RD--H--SD--D--HV--N-----RE--QSVNQ-A--S-A--	65

<- fin de E1

GROUPC.con	MKmqIpketLSeRLsaLODKYldhYEbDSKdI?mQI?YVqlIR?ENAIffaAREbGi?tlnHQVVP?iNI	65
HPV39	--E-MK--Q--NV-----EY--Q--S-YD--N--KCV--N-----Y--R--MH-ID--T--	69
HPV18	-----I-----D--Q--V-----Q-----AY--	68
HPV45	-----S-----N--S-----L--L-T-----TK--P--	70

<- fin de E1

GROUPD.con	MEtLcqRLnaCQeKILDcfE?DS?ki?DbI?YVWkavR?Env??YkArenn??t?lnHQvVPclqV	55
HPV51	-----H--V-----Y-L--D-LV-Q--N--TLL-Y-AAMF-A--R-LRTI--ATT--	64
HPV26	-----N-----YY-L--N-LT-Q--D--L--Y-CAIF--G-MQCI--STV--	64
HPV30	-----D-----N--K--E--V-----H--VL--Q--I--K-R-----	64
HPV53	-----D-----R--KN-T--D--Q--IY--M--K-G-----	64
HPV56	-----S-----N--K--RC-A--E-----H--LY-----DI-V--N-----	64

<- fin de E1

GROUPF.con	MEtLA7RLDaCQe?lLELYEKdS?kLedqi?HV???R?E?v?lykARecG?t?7Ghq?VP?L?v	48
HPV27	-----E-----T-----N-----K--AQV-L--N--H-F-----M--RV-CTT--A-T--	64
HPV57	-----S-----T-----N-----K--AQV-L--N--H-F-----M--RV-CTT--A-T--	64
HPV2a	-----E-----T-----N-----K--AQV-L--N--H-F-----M--RV-CTA--A-T--	64
HPV3	-----E--V--DKI-----D-----N--QLN-L-QAI-----L--HI--V--P-S--	64
HPV10	-----E--V--DKM-----D-----T--HLL-V--NAL-----L--HI--V--P-S--	64
HPV7	-----K--R--L--Q-----Q--KQ-QHH-L--KYI-Y-S-IY-T--QM-IXHL--V--S-D--	64
HPV40	-----N--R--L--Q-----QH-KE-QQH-L--KYI-Y-SAIY-T--QM-IXHL--V--S-D--	64
HPV32	-----K-----Q-----E--KH--KHVQ--KCL-I--AAL-F--M--YAQV--I--A-EI--	64
HPV42	-----R--K-----Q-----EH-RD-QKH-E--KCL-N--A-V--M--FANI--I--T-ET--	64

FIGURE 13A

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

-- fin de E1			
GROUPG. con	MSQMEaL77R1D71OEqil1lyE7da??1EdqI??WaliR?Enai7h?ARK?G77r1G1q?P?lav	51	
HPV1a	--N-SS--L--LMN--Q-KLI--KQ--Q-QVLF-F--N-VH-I--A--S--S	64	
HPV63	---NN--V--L--K-KDI--MQ--L-Q-QVLF-Y--K-IM--V--S--A	64	
HPV41	---R-LE--YI--K--VD--H-RL--L-R--VYVL-QE-HA-V-GRA--ANT--	67	
HPV4	---VA-F-A--A--HI-SQEST--S--QY-EN--K--N-Y--Q-LTK--PL-T--	64	
HPV65	---VA-F-A--A--HI-SQDDT--S--RY-EN--K--N-F--Q-LTK--PL-T--	64	
<- fin de E1			
GROUPH. con	MenLseRFNaLQdqIMniYE?a??tle?QI?HWq7LRKEav1lyfAR?kgvtRIGYQpVP?lav	56	
HPV19	-----V-----S-AE--S-E--I-----R-----I-----T--	64	
HPV25	-----V-----T-AQ--A-E--I--R-----Q-----A-M--	64	
HPV14d	-----D-----T-AN--S-E--T-----QN-----V--T--I	64	
HPV5	-----A-EQ--QA--K--T--P--Y-E-----VK--	64	
HPV5b	-----A-EQ--QA--K--T--Y-E-----VK--	64	
HPV5d	-----A-EQ--QA--K--T--Y-E-----VK--	64	
HPV47	-----E-----A-EQ--KA--L--T--T--Q--IN-----A--I	64	
HPV12	-----V-----A-EH--T--A--TL--R--Y--Q--I-----T--	64	
HPV8	-----V-----A-EQ--A--A--LL-----Q--I--I-----P--	64	
HPV15	-DT-----EN--D--SGRDDI--T--L--Y--Q--Q--F--KH--M--P--T	64	
HPV17	-D-----V--EN--D--SQEDI--T--K--L--Q--Q--F--Y--KH--M--V--P--T	64	
HPV9	-T--A-----ET--DL--SGRED--QS--D--T--Q--QI--HY--KH--M--P--T	64	
HPV49	-A--NA--V--EM--D--SGKED--T--E--KL--Q--QA--F--KHSIM-----PM--	64	
Début du domaine d'activation			
dans BPV1	->	<- fin de E1	
GROUPI. con	MXMe?a?erl??aQetqqliEk?S??L?di??yV??vR?E??Llyaar?kG7??1g??pVPp??v	43	
BPV1	--T-C--HV-----S-DK-Q--IL--TA--T-MT-----K--VTV--HCR--HSV--	64	
BPV2	--T-C--HV-----A-DK-Q--IL--TA--T-MT-----K--VTV--HCR--HSV--	64	
EEPV	---SA-SDH-LA-----C--D-RL-Q--AC--GA--R-KL-----T--LXTI--CV--CS--	66	
DPV	---SA-K-Q-LA-----T--D-TD-K--IDS-GP--R-HG-----N--LIV--LN--CS--	64	
COPV	---KLS-A-DLL--ELLS-Y-QH-QS-A-QSRH-SLI--K-QV--Y--G--IMRI-MQ--QS--	64	
CRPV	---ALSQ--DSI--ELLS-Y--E-TS-ESQLOH--NLI--K-QV--HFCKKH--IRQ--YT--SLI7	64	
BPV4	-VSLEA-FDAV-DQIL-VY-ND-MT-ELCLQ--ALI-R-NA-Y-Y--QQ-KTR--LYT--TR--	64	

FIGURE 13B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

GROUP A. con	SKaKA?QaIELO1?LEtln?t?Yste?WTlQqtSlE?ylt?P??cfKKhgyIvevQfDgDk?NTMhYTNW	116
HPV31	---L---MM---N-E-KH-D-M---L---A-TG-L---VH---D---	134
HPV52	---C---A-A-K-Q-DG---HRAE-QKY---IT---Y-H-H-D---	134
HPV35	---M---M---T-E---D---E-I-L-T-V-TR-L-DV---A---Q---	135
HPV35b	---M---M---T-E---T---E-I-L-T-V-QG---V---Q---	135
HPV16	---N-L---T---IYNSQ-N-K---DV---V---A-TG-I---IC---	134
HPV33	---T-F-V---MA---SKSQ---SQ---VH-CE-PK---Q-E-T---Y-H-K-D---	134
HPV58	---T-F-V---MA---ASP-K-DE---VH-SE-QK---K-I-T---Y-H-A-D---	134
RbPV1	-R---HK---V---A-S-QNSE-MH-E---DA---MM-E-KG---T-VF-T-L-C-U---L-VL---	135
GROUP B. con	SeaKGHnAIEaQmbIEaLle?eygmEpVTlQdTSyEmVITpPKrCFKKqGkTVEVk?D?c?dHtMdYVvW	126
HPV6b	---RT---S---E---Q---R---F-G-AH---	134
HPV11	---T---AKTQ-V---H---F-G-E-V-E---	134
HPV13	-Q---E---T-T-S-F---R---Q---Y-CHT-R-S---	134
PCPV1	-QT---E---T-TV-KS-T---E-F---H---Q---RY-CHAE-S-H-L---	134
HPV34	-RS---L-LA---H-SS-NT-E---Q-V-Q-V-D-Q---G---RY-CDK---Q---	135
GROUP C. con	SKsKAhkaIELOMAL?glAQs?YntEeVTLqDTceELMhTeP?qCFKKgG?TV?VyfDgDkHcMhYV?V	129
HPV39	---C---YQ---ESV---IE---K-SH-H-Q-K---Q-T-E-VY-D-C-A---L---	139
HPV18	---Q---R-K-D---TH---Q-Q---T-A---	138
HPV45	---K---K-H---S---K-H---V---	140
GROUP D. con	cKaKAc?AIE?qialSL?kt?Yn?EeVTLrdtceem?tePKqCFKK?G?ieVvFDg?KdH?m?Yv?V	112
HPV51	S-Q---Q---MMH-Q---E-SD-M-P-M-E-Y-L-CVA---G-ITVI-I---H---A-D-TS---	134
HPV26	---Q---WQ---IH---Q---IH-D-T-A-M---SY-YH---H---E-TTVI-V---CH-E-T-D-IR---	134
HPV30	---V---I-M---Y-E-KV---K-V-M-H-A---S-KR---K---HTE-V---	134
HPV53	---V---L---C-E-M---V-S-Y---Q-QH---S---RAE-V---	134
HPV56	---S---V---ST-I-N---L-L---K---E-QH---S-M-C-Q-A---	134
GROUP F. con	skAKA??AIEvqlalqtL?qsay??epVTLrdTs?EmV?a?PKKCaKK?G?tVeV?fDg????aM?Yt?V	101
HPV27	---CQ---M---ST-A---CL---D-P---K-LS-L-K---SSRD-I-G---	134
HPV57	---CQ---M---ST-A---CL---E-P-R---K-QS-L-K---SCRD-I-G---	134
HPV2a	---CQ---M---ST-A---CL---D-P---K-QS-L-K---SSRD-I-S---	134
HPV3	T---RS---HVS-Q-QH---HAQD---R-DTV---R-L---RY-DENK-C-VQ---	134
HPV10	T---RH---HV---Q-QE---AH---R-DTA-G---R-I---RY-DESK-C-VQ---	134
HPV7	---HA---M-MC-ES-QTTE-NL---Q---Q-L-L-E---F-G-K---R-CHENH-H-L---	134
HPV40	---HA---M-MC-ES-QTTE-NV---Q---Q-L-L-E---F-G-K---R-CHENH-H-L---	134
HPV32	-R---HV---I---E-L-TFGT---QE---Y-H-E---L-Q-R---V---HPEN-H-A---	134
HPV42	CR---HM---IH---E-L-S-GK---QE---H-L-LTN---F-Q-R---I---KQD-H-A---	134

FIGURE 13C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

GROUPG.con	se?nAK?Alem?l?L?sl??SpygsE?Walqdtis?El?la?P??t?KKG??v?v?iDndp?N?i??t?W	99
HPV1a	-QEK--T---V-H-E--KD---T-D-----R-F-P-AG---S-STLE-TY--N-D-Q-RH-I-	134
HPV63	-QDK--T---T-Y-SG-RD-Q---Q-----R-IF-P-DH-----QTIE-IY-E--N-S-RH-V-	134
HPV41	--A---F---QIK-E--KA---AA-G-----E-TK-RY--E-SR---L-QP-TLM-----E-L-EVVL-	137
HPV4	T-Y---Q-QIH-T-Q--LK--FA--R-T-T-V-A--INTS-QNCL---YD-A-V---RQ-AMLY-N-	134
HPV65	T-Y---Q-QIH-T-Q--LK-----R-T-PEV-A--INTA-QNCL---YD-S-V---RY-AMVT-N-	134
GROUPH.con	SEakAKeAlgmvlqlqSLQkS?fg?EpVtLvdTS?Et?rsaPenhFKKGp?pvEViyD?dpdMan?YTBV	119
HPV19	-----EY-T--S---A--Y-----Y-----M-I-----K-A---L----	134
HPV25	-----E-K--S---T-YK-P-----M-I-----K-A---A----	134
HPV14d	-----Q-----Q-S--S---G-F-----VS-----N-I---A----	134
HPV5	--T---A---E---T-D-AH-----I-F---G---L-----N-----L----	134
HPV5b	--T---A---E---T-D-AH-----T-F---G---V-----N-----L----	134
HPV5d	--T---A---E---T-D-AH-----I-F---G---V-----N-----L----	134
HPV47	--R---Y---E---A-AL-----T-FK-----V-----K-EA---L----	134
HPV12	-----IM-----EYAS-N-----A--YHNV--H-----V-----KE-E--V----	134
HPV8	-----Q--IM-----E-AD-----I--YKN-----AT-----KQ---V----	134
HPV15	--T---D---IL-----AY-K---TQ--L--V---A-C---QHI--MF-K--E-INV--V-	134
HPV17	-----D---L-----PY-K---TQ--L--V---P-A-C---QHI--MF-N--E-LMS--V-	134
HPV9	--Q---D---L-----R-AY-Q---AQ--L-AV--P-AYA---QHI--V--G---VMS--I-	134
HPV49	--T---Q---M-T-----P-K-K---N--L--YHAP-AQC---YNI--F-G--E-LMV--A-	134
GROUPI.con	?qe?AkqAlemqL???sL??s???nepWal?DtSwery?a?P??t?KKGar?veVeydgn??H??vYt?e	92
BPV1	C--R-----SLQE-SKTEFGD-----L---D--MSE-KRC-----V---F--AS-TN---VY	134
BPV2	C--R-----SLQE-SKTEFG-----C-L---D--MSE-KRC-----V---F--AS-TN---VY	134
EEPV	TA-Q---C---IVEE-LH-PVAX-----T-L---Q-A-KGCL-----V-----SS-KT---A-	136
DPV	KCLE-R-----LGN--KE-PWC-----C-L--G--Q-P-AE-L-----L-----SST-KT---A-	134
COPV	S-AK-----QS-YID--LH-KYA---T-C---R--LV-E-AY-----GKQID-R-GDSEE-IVR-VL-	134
CRPV	S--C-----V-YIE--LR-PYSD---T-Q---R--FESP-QK---NPAI---Y---DRG-NNE--L-	134
BPV4	SEQK--D--K-Y-CLE--QK-EFA-QR---V---I-TFK-P-EN-L--RGQH-T-I--Q-AM-SNV--L-	134

FIGURE 13D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

GROUP A. con	??IYi?...ee?...?cIvV?G?Vdy?G?YY...vh?g??tYfv?F?edakkY?k??...	WEVHvGgqV	156
HPV31	KF--LC...IDG.Q---E-Q-NCK-I---...E-HI---H-T-E---GTGK.....A---		192
HPV52	KE--LL...G-C.E--I-E-Q---Y-L---...WCD-EXI---K-SN---Q-CVTGV.....		192
HPV35	TH--L...-DS.I---K-L-N-K-I---...Q-VE--Y-T-R-E---G-KNI.....		193
HPV35b	TH--L...-DS.I---K-L-N-K-I---...Q-VE--Y-T-R-E---G-KNI.....		193
HPV16	TH--C...-A.SV---E-Q---Y-L---...E-IR---Q-KD-E-S-MKV.....A---		192
HPV33	GE--I...-D.T--H-T-K---I-M---..I-NCEKV--KY-K---A-S-TQM.....		192
HPV58	SE--I...-T.T--L-A-E---V-L---..I-GNEK--KY-K---S-TQL.....SR-		192
HPV1	GH--VV...GDN.GWKTf-EA-NV-LH--..TVA-EKV-Y-Q-Y---GHGNGNGDGYE---T-		199
GROUP B. con	T??Yvq...dnd.kWkv?snVD?kGiYY.?tcg?fkYvF?keAkkYGst?h.....	WeVCyGstV	177
HPV6b	-DV---...-T---H---A---...Q---V---E---K---.....		192
HPV11	-HI-L-...-S---T-S-A---...Q---N---Q---N---.....		192
HPV13	-YI--F...-T-..T-KG---Y-L---..IH-NL---LE-E---E-LQ.....I---		192
PCPV1	KYI--C...E--R-Q-KG---I-L---..MV-QC---ID-E---Q-SK-LQ.....D-K-		192
HPV34	-FV-YV...LEG.-Y-S-H-YH---E-QDKE-V-TQ-DRD-R-VKGI.....D-N-GK-		194
GROUP C. con	dsiYY?...t??giWdKtA?CVsyvG?YY...?keg??tyY??FksecEkYGnagt.....	WeVhyggNv	178
HPV39	GA--X...NWID-C-EG-D---I---..MH-HLKV--EV-IQDA-R-T-K.....N-I		198
HPV18	--V--M...-DA-T---T---HR-L---..V---YH-F-IE---T---...F-H-		197
HPV45	---I...-ET---A---V---..I-D-DT---VQ---...H---...Q---		199
GROUP D. con	k?vYy?...gd?g.V?Kv?s?Vdy?GIYY...?hdg?K?YYtdFkdEA?kyG?k??...	WeVhn??s	153
HPV51	-FI-IY...DNDK.-V-TNGH---T---..TVNSK-E-VQ---KI---AQQ.....Y-YGTV		191
HPV26	-Y---K...T-I.-C-GTGD-AK---..TQGAY-Q-V---Q-E---TGVQ.....A-VCGQV		192
HPV30	QV---C...-N.-T-P-V---K---..V---N-V---N---V---Y-GT.....GHE-		192
HPV53	-V---C...-ED.-C-S-A-S-E---..I---H-T---N---T---C-GT.....GKQ-		192
HPV56	-YI--K...-C.-Q-C-G---R---..V---H-T---EQ-K-F-C-NI.....ENE-		192
GROUP F. con	??iyvQ??d?..?V?KV?G?Vd??GLyY...?h?g????YvdF??ea?cYGrIg?.....	WeVhvgg?V	138
HPV27	HH---.DAH-D.T-H---P-K-EL---..E-D-VRVN---GT-SL---T.....A-R-		194
HPV57	GH---.DIN-D.T-H---P-Q-EL---F...V-D-VRVN---GI-L---T.....Q-R-		194
HPV2a	GF---.DTITD.S-H---P-Q-EL---..V-D-VRVN---GT-SL---T.....A-T-		194
HPV3	RE-I--NYTD-N...-V--A-L-SHE---..M-E-QKTF--K-KDD-RV--D-T.....D-K-		194
HPV10	REL---NYSD-R...-V--P-K-SYE---..T-ENMNIY--N-KDD-CV--E-K.....K-		194
HPV7	TAV---..VE-T...-T--E-Q-HR--F...TVH-CTTY---GK-H---K-ND.....T-I-SR-		192
HPV40	TTV---..VD-A...-T--K-Q-YK--S...TVH-CTTY---AK-Q---K-NR.....T-I-SH-		192
HPV32	TF---..TL-G.T-C--Y-H-CYA---..IVDNMKQF-CN-KN-KK---Q.....D-TQ-		193
HPV42	TY--I-..TVQC.T-C--Q-H-CHA---..IVENMKQF-CN-KE-KK---DQ.....D-NQ-		193

FIGURE 13E

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

GROUPG.con	??Yq.???.W?k?g?vU?G?yy.?dh?g?k?Yy?lF??a?r?S?TG?.....?v??g??	130
HPV1a	NHV---MGDDV..-R--SSG--AV-V--LE-D-Y-N---AE-SKY-T-Q.....YA-NYR-KR	194
HPV63	RHI---MGDR..-R-AASD--VH-VF-.LEYD-V-N--D-QE--N-Y-K--R.....Y--QYE-KR	194
HPV41	KWV--I.TPTDE..-Y-AR-GI-DT-I--I--ESV-M--R-DN--EN--E--T.....V-YR.L-SA	196
HPV4	DFL---DMKEQ..-H--K-E--YD-L-F.T--T-ERA-FT--SSD-Q--R--L.....V--HFKTQV	194
HPV65	DYL---DVNEI..-H--K-E--YD-L-F.T--T-ERA-FT--STD-H--R--L.....V--HFKTQV	194
GROUPH.con	??iYy?.d?dd?..WhK??sgvn??GiYy..??Gt?k?Yy?lFaddA?ryg?tG?.....wEVkvNket	163
HPV19	KFV--V.-E--K..--SE---HT-L-F..MQ-N-RH-----RK-SA--H.....	193
HPV25	RY--V.-D--K..--SA---HT--F..MH-S-RH-----R-SN--H.....D-	193
HPV14d	KH--Q.-D-EQ..--SA---HT---.MQ--RH-----T-SK--H.....	193
HPV5	TYV--M.-A--K..--AR---HI---.LQ---N-----K--T-E.....	193
HPV5b	TYV--M.-A--K..--AR---HI---.LQ---N-----K--T-E.....D-	193
HPV5d	TYV--M.-A--K..--AR---HI---.LQ---N-----K--T-E.....	193
HPV47	TFV--M.-S--V..--TT---QT---.LY---H-----K--SA-E.....	193
HPV12	KYV--M.-PE-V..--TT---QT---.LH-D--H-----G-RH-SK-Q.....	193
HPV8	KH--T.-A--K..--TT---QT---.MQ-S-RH--V-----R-SA-E.....I--D-	193
HPV15	TY--Q.TL--T..-N-VEGXIDYH-A--.LE--L-V-IQ-EV-A-F-K-I.....H--ED-	193
HPV17	SF--Q.ML--T..-N-VEGR-DYH-A--.ME-SL-V-IQ-EV-A-F-K-R.....H--ED-	193
HPV9	NF--Q.TVN-T..-E-VQGH-DYF-A--.FE--V-T-IN-DK-A--R--V.....H--DI	193
HPV49	KE--FV.-S--M..-Q-VQGE-DYA-A--.KD--I-Q--T-----V--TS-Q.....Y--RI-N-	193
-> Début du répresseur E2-TR pour BPV1		
GROUPI.con	??y?r??e??g..W??a??gaD??GlyY??????vYy??F??daar?a?tGh.....y?vr?d?dr	123
BPV1	SNL-M-.T-D.-..-QL-KA--GT---CIMAGAGRI--SR-GDE--F-T-----S--Q--	193
BPV2	SKL-M-.T-D.-..-QL-KA--GT---CIMAGAGRI--SR-GEE--F-T-----S--Q--	193
EEPV	STV-V-GT-EE-..-ET-VCA--GQ-I--C.AGMSSK--FET-ET-R-V-R-----WT--N-V	196
DPV	MSL-L-KPDEE-..-ET-TG--AD--F-.TIMSGTR--EL-ER--Y-T--T.....WT--N--	194
COPV	LDI-YQ.D-FDT..-EK-HGKL-HK--S-.MHGTQQ--VD-EEE-NKY-E--K.....EILNQPTT	193
CRPV	GIFLIG.MADGE..-VKTES-V-YR-I--.VDSEGNY--VD-ST-G-FAAN-----D-VFQNM-	194
BPV4	KEV-YV.D-TET..-HKTSSDL-YD-IF-.IDNQGKI--VN-QD--LY-NS-M.....GQ-HFESKV	194

FIGURE 13F

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

GROUPA.con	IvcP?.SvIsa.....?e?St?eia??l???t??k?.....??gt?e???t????	179
HPV31	--F-E-----D-I-FAG-VTK-PTANH-T-SHS-T.....CAL--S-GVRRATTS	242
HPV52	---A.-S-.....H-V--T-T-VH-C....-E..S-T.....SAVSUGAKD.-HLQP	234
HPV35	---E-----T-L-A---TQ-HAYNT-E-H.T-A.....CSV--T-TQK-NH..	240
HPV35b	---E-----T-L-A---TQ-HAYNT-E-H.T-A.....CSV--T-TQK-NH..	240
HPV16	-L--T-----H-V-SP--IRQHLANHPAA-H.T-A.....VAL--E-TQT-....	237
HPV33	---T.-IS-.....MQI--T-T-DIQTDNDHRPP.....QA	223
HPV58	---T.-IP-.....DQI--T-T-DPKTTEATNNESTQGT.....	226
RhpV1	MHYSO.-S-...ATHCDKL-P-V--VSG-QHINPSPPPANPSAKENVSS.....	245
GROUPB.con	IcspA.sVsSt....vqEVSi?epttytp?qtt??st??s?st?e??vq?.....p	212
HPV6b	-----T-----P-S-----A-----LV-S--X-DA--T.....-	235
HPV11	-----R-----A-----A-----APTVACTTEDGVSA.....-	236
HPV13	-----AG-AS-STITS-QA--AV-C-AS-EC--A.....-	238
PCPV1	-----AG--SHSTTTLAQATCAV-SIAT-DS--A.....-	238
HPV34	-.CF-.P-F-P.....C--TP-IVRPLHTSNSSRAQDAGVP.....	230
GROUPC.con	IdCaD.SMCST...SDdtVsaJqlv?QLqht????s?i?avgT?Kt??qt.....p	215
HPV39	-H-P-----GS-PI-E-YTE-SH-TATH-TATTPC-Q-IPP.....-	244
HPV18	-----K-----PSPY-S-V----A-YG-----S	244
HPV45	-----I-R-----ASTSTPK-A-----P-PHI-----	246
GROUPD.con	IyCpd.sVSST?...?r?nvS?veTv?ey????T?tt?tt????????a?????.....?	179
HPV51	-T--E.Y----CSDAL-TIT--EQLSETP-TRPL--C.VGAKEA.QT.....Q	236
HPV26	-C--E.F----C...SSHQI-TAK-AEPVSNAT-Q--EAYVPVGKETE-P.....Y	240
HPV30	-----L-S--P--V--WYH-YQ-P--STPVGAEKA-SSAR.....	241
HPV53	-----F-S--S--H--YSHK-P--S-PVGTYEASSSLR.....	238
HPV56	-----C-Y--P--H--WTHK-T--TS-S..VGKQDA-VSHR.....	239
GROUPF.con	Izh?s???ast????s??e??sp???a????a????????????????????????p	151
HPV27	-H-T-ASV---QATA-DD-PL--IRL-VSPVP-PASAASARTG...TAPPTNLLCTAPAPPS.....-	254
HPV57	-Y-T-ASV---QAAT-DDDTL--LRS-AAAVT-T..ATA.....TTAVPPT.LQDSAQAPSS.....-	249
HPV2a	-H-T-ASV---QASA-DD-PL--IRT-VSPVP-PVAASAESTGAGRAAPPTQALCSAQPTS.....-	257
HPV3	-H-D-.FDPVS....-TR-IPA-GPLYACTTQ-P.TQAQVGASEGFQKRQRLETVIGEQQQQQQQQQQ	258
HPV10	-H-DA.FDPVS....-TR-IST-GPVCTSHTTPASTQAQVGASEGFQKRQRLEAVDGQHQQQRQSKDS	259
HPV7	-CSP-.TVE..GLPIVAPVDIRHPA.-TDATD-TKVHDAPYALPASTTKVYNDSHA.....-	245
HPV40	-CSP-.TIEENGLPIVETADAR-PTT-TDTPD-PATATTETVGPQA.....-	239
HPV32	-VSPA.SI---TTT..EA-VS-SGLTELVTITDLINTIPTITITS...NCOPDGTGILYKOFTPTT-	257
HPV42	-VSPA.PI---TST..DA-IP-TGSTKLVOOVCTTNPLHTTTSID.....WHHADCTDGTAYNVPIQTS-	255

FIGURE 13G

début de E3 pour EEPV ->

<- Fin du domaine d'activation N-terminal conservé dans BPV1

Début de la région charnière

interne n BPV1 -> ->

E2 coupé ici dans BPV1 produisant le répresseur E8-E2

GROUP I. con	?y?sv?s??s??r??	129
BPV1	V-AG-S-TS-DF-DRPDGVVASEGPEGDPAGKEAEPAPQVSSLLGSPACGPTRAGLGWVRDGP RSPYN	263
BPV2	V-AG-S-TS-DF-DRPDGVS.ASEGPEGDPAGKEAEPAPQVSSLLGSPACVPIRAGLGWVRDGP RHPYH	262
EEP V	I-H-TFGAPPHS-NDRDCIEGFMSDAGERRGSRGSDTTDRALPYPAARQSPICRPVRTGENRSRAVHRQA	266
DPV	T-H-.H-AP-HS-ET...IEGLWNSGGRERG.RPTXSPDRAVLHTPPGGNTVHGQVRA CENRGRSINRPT	259
COPV	IPITSAAGT-GPELPGHSASGSGACSLTPRKGPSRRPGRSSRFPRSSGGRGRLGRGSGELPPQPQPSS	263
CRPV	LSS--T-SPQPLVSAPEDTVPEEAPDSAVPAAQKKTGPKTTRTLGRRRSRSPGVQRRPAAKQRQAAPDEA	264
BPV4	LSP--T-SLRVGSTGGQRGQTGTGDHARGRSRPSRSSRDARGR.....	237

FIGURE 13H

GROUP A. con	??krrr??????n?????l1??d??s??d????g??sa??.....ctnk?R????a?ti.....	201
HPV31	T.--P--IEP.EHR--THHPNK--RG--...--SVNC-VI--AA.....--QT-AVSCPA--.....	293
HPV52	PQ----PDVTDSR--TKYPNN--RGQQ.--STTR-LVT-IE.....--G-VANTTC-A.....	288
HPV35	..--L--GGTELPY--PTKRV--SAV--...--R...--VY-TSD.....--D-CGSC-T--.....	288
HPV35h	..--L--GGTELPY--PTKRV--SAV--...--R...--VY-TSD.....--D-CGSC-T--.....	288
HPV16	..IQ--PRSEPDTG--PCHTTK--HR--...--SA..PILT-FW.....SSH-G-INCH-H--.....	286
HPV33	AA----PADTTDT..AQPLTK-F.CA.DPALDNRRTART-TH.....--Q-TVCS-NVA.....	274
HPV58	..----LDLPDSRDHTQYSTKYTDCAVDSRPRGG-LH-TTN.....--Y-G-NVCS-KVS.....	279
RbPV1	PA--V-RSDSGGDPVRALDGRSVLCCSAHHNATGS-GDSDT.....	289
GROUP B. con	prKRARgpa???gn?????????????atlCvahi??vds?nnni?nnyn?hqrtnns?saat.....	255
HPV6b	-----VQQSPC-A.....--GP--G-H-LI--HDQ-----H-S--.....	285
HPV11	-----.....--NH-----R-RS--TI--V-D--K-----CH-----.....	284
HPV13	-C--Q--RPI--PON.....-Q-IV--TDYDTL--A--NV-H--NKG-D--YC--.....	294
PCPV1	-Y--L--HCARKLON.....-SHIV-ATDRGTL--E--INNH-YN-NH-Q--N-SG--.....	294
HPV34	..--H-QCDPDE-PLDFVHNLQPTTDS--Q-TL-NVA.....	266
GROUP C. con	a?kRPqCgltE??h?g?Vn????n??l?m????.....KRRklcsGNTT.....	246
HPV39	SR-----AV--PTEPDG-SLDHL-NP-H-STGH.....-T--Y-SC--.....	291
HPV18	-AT--GH--A-KQ-C-P--PLLGAATPTG.....	287
HPV45	-T-----QH--R--THVH-PL-C-STSE.....-V-----.....	291
GROUP D. con	pgKRpRltpdst??i??????a?????????????tdnIm?????g?????n?????ag?kT?.....	206
HPV51	QR--Q-----S.....TISPLSV--QIH...C-SGSTATGGHQ-ATQ-A.....	282
HPV26	---R--SG--T-VI-VTTVTI-A...TPCQSV-Y--NLH...STSGGHPGRDT-SDQ-V.....	297
HPV30	-----T-----DT-RQSA..-RESHANKV..N-N--..RQCL.-GATCY-TEVDG-Y--T.....	298
HPV53	-----T-----DS-TQSTTT-RESYAECVARN-----NTRKHP-GASCH-TEID--Y--A.....	302
HPV56	-----R-SEFDSSRESHAKCVTTHTHIS...D--D.....SRSRSI-NNHHP-D--T.....	292
GROUP F. con	p?kr?r?????????????s?????????????d??s??prr???d?d??.....	163
HPV27	-A--Q-VIVGQQL.RPD-TRTVGEGQVEC.....YDKRSISNTH-TA--WDHG-T-TV.....	307
HPV57	-P--Q-VIVGQWQ.QPD-TRKVRGQVEC.....QNDRSIRHPD-TD--GHS-L-AV.....	302
HPV2a	-A--Q-VIVGQHP.RPD-TRTVGEGEVEC.....YNKRSIS-SNRID--VGHG-T-SV.....	310
HPV3	QQHTQTTPAQTT.....ERARQPLDTRTRDR-TTCPE-IGHRS-P-CV.....	302
HPV10	TQ-AA.....ERAGGQVDSRTRLC-TR-AH-V-HPS-P-CA.....	296
HPV7	-R--R-DGDLISAVDGC.....GRKYVDTCNRARSP-IE-NMKI-NSGGGIST.....	295
HPV40	-R--R-NGLPITTTVGK-L.....GGEYVDTADRTRIP-PE-NNGH-NCGGGSST.....	290
HPV32	-R--Y-QSLQPPTKHLQHY.....GYTVVPVDPGSRV.TSDNNKQ--HPCGQTT.....	308
HPV42	-R--Y-QCGQSPSQHLQH-NPSIP.....SIPSASVDPGLCGVRTSENCNK--NHCGSQAT.....	312

FIGURE 13I

GROUPG.con	?????????????????????????????????????	136
HPV1a	SRSRGGGRAGESTPSRTPGSVP.....	288
HPV63	263
HPV41	266
HPV4SSFDTEEQQLPGPS	219
HPV65PSFDFEEQQLPGPS	219
GROUPH.con	???:qrrrsr?rsrsrsrsrs?s???l??l??srbs?????r?????????????????????????	231
HPV19	TQ-R-K---KSK-----L-SNR.RSRKSRLASTTRG-GRGSPT.....	309
HPV25	AQAR----KS-----Q--RIRSRSRSRSESQSXRRS-SRSRK.....TSATRGR	316
HPV14d	ETRQR----KS-----LR-ASRSQSSERR-YRSRSRS-QKEVSRL.....	311
HPV5	.Q-Q-----H-----K-QTH-TLS-TR---TSLTKT-ALTSRSRSRGRSPITCRAGGGRSPRR	330
HPV5b	.Q-Q-----H-----K-QTH-TWS-TR---TSVGKT-ALTSRSRSRGRSPSTCRAGGGRSPRR	330
HPV5d	.Q-Q-----H-----K-QTH-TLS-TR---TSLTKT-ALTSRSRSRGRSPITCRAGGGRSPRR	330
HPV47	.Q-H-----S-----S-QTH-STTTT-TTYRSR-T-LMKTRA-SRSRSTSR.....STSTTSRRGG	322
HPV12	.E-Q-----Y-Q-N-----Q-QTRALGA-SV---SRSPSVTOIDNRRS.....RSQ.S	309
HPV8	KEQRS--H-T-----L-VRAVGS-TVSRSR-S-LTKAVRPSSRSSR.....GRAT	314
HPV15	GA-SIDSAPESPAN-QL-STSVS-RKR-PPR-EAR-YHRKESSPTTTTTTRQKROQGQRQEDTARRSRSTS	277
HPV17	GTDASPIHAASRS-PA-GL-ATSSTR-TQR-SPR-YRRKASSPTATTTRH.KRQDI.....RRSRSTS	270
HPV9	GGETSKHTL--SG-PIT--LPATTVP TGGS-SR-YORKASSPTTRKKRQRQEGEGEGEGETHYRRQ	277
HPV49	RKDSSPTAA-NS-KEVSRLSRSTRTHRREAST---QKASRS-SRSRS.....	311
<div style="text-align: right;"><- fin de E3 pour EEPV</div>		
GROUPI.con	????????????????????????????????????p?????????????????????????	130
BPV1	FPA GSGGSILRSSSTIPVQTVPVDLASRQE E E.E.QSPDSTE E EEPVL-RRTTN.DGFHLKA.....	323
BPV2	FPA GSGGSLLRSASTP VQPVPVDLA PRQ E EENQSPDSTE E EEPVT-RHTSDADGFHLKA.....	324
EEPV	PYSAPS PGGSSVGPDSPSESSRVPL....VLLPGPSDPA...PPS-DSTDVIAEGDKPERFSILSKP	328
D PV	PYST PQSP RSGV GPDTT SPLSP VPQNRCVSLPDGFG RGEED HPPS-DQH DVI PHPOPKER FSI LFGSS	329
COPV	SWSPSPQQVGSKHQLRTTSSAG.....	287
CRPV	DSAAGDIRPPA PEDVGRRTTVGRTPPGRR.....	295
BPV4QORA QSSSR SRSRSRSP TKGHSSGRDT RL PSPGRP PGRRRG TPERERC PG TPPT PD	299

FIGURE 13J

GROUP A. con	201
HPV31	293
HPV52	288
HPV35	288
HPV35b	288
HPV16	286
HPV33	274
HPV58	279
HPV1	289
GROUP B. con	255
HPV6b	285
HPV11	284
HPV13	294
PCPV1	294
HPV34	266
GROUP C. con	246
HPV39	291
HPV18	287
HPV45	291
GROUP D. con	206
HPV51	282
HPV26	297
HPV30	298
HPV53	302
HPV56	292
GROUP F. con	163
HPV27	307
HPV57	302
HPV2a	310
HPV3	302
HPV10	296
HPV7	295
HPV40	290
HPV32	308
HPV42	312

FIGURE 13K

GROUPG.con	??g?????	137
HPV1a	288
HPV63LARGESESARASA-SGERV	282
HPV41RGNGG	271
HPV4	TSYSEVTEQASPTRRRKPRKSDATSTTSPETEGVRLARRRRREGKSGPGSGETPRKRRRGCGRG-ETELG	289
HPV65	TPTYTELTAQASPCGRGKSRESQPTSTTSPETSGLRVRRGRQRKSGPGGETPSKRRRGCGRG-ETRL	289
GROUPH.con	r?x????????????r???????s????????????xgg??g????x?r?b?b????krrx???as??	252
HPV19	..ATSDQSSRSPTSATSTTSLR-RCSSRVGSRGG-SRYGRSRGRGKRSRE-P-PTNT-----QSG--RL	377
HPV25	GPGSPTTTTSDRAA-SPSTTSSATSQRSQSRSRAGSSRG-RGRGG-R-HRLSESPTS-----ESG-VRL	386
HPV14dITTTTRGRGRGSSSTSSKRSQ-ARGR-RGGS-GR--S-T-PTSS-----ESE--RQ	367
HPV5	-S-SPSTSSSCTTQ-SQRARAE-STTRGARGSRGS---SR-GRGR--G--S-S-SPAH---GG..-AKL	398
HPV5b	-S-SPSTYSSCTTQ-SQRARAE-PTTRGARGSRGS---SR-GRGR--G--S-S-SPAH---GG..-AKL	398
HPV5d	-S-SPSTSSSCTTQ-SQRARAE-STTRGARGSRGS---SR-GRGR--G--S-S-SPAH---GG..-AKL	398
HPV47	-GSSTRQSRSPSTYTSKRSREGHTRGRGRGRQGRA-SSG-REQR--R--F-T-PDSS--V--E..-PKY	390
HPV12	-G-GGRGSSTDTTTKRRRSRSS-SHTKRSQRGERGR-ER-GRGK--D--S-T-PTP.---AGSR--RQ	378
HPV8	ATSRRRAGRGSPRR-RSTSRSP-THTFKRSQRGGG-R-RGRGSRG--E--S-T-PTPT---GE..--RL	382
HPV15	-G-QEISRGGNQRR-RRSR.....ETSIAPWG---RSRRGPTT-SQ-K-L-RSRRSKS-SRG--PR	340
HPV17	-G-QAISRGGERRQ-RRER...-YSRDSRSRPNRG---SS-.GPTT-SQ-R-L-RSRRSRS-SRG--AG	336
HPV9	-S-SKGRTEETERGGERRR.GR-SSADSTPTDRR--RGG-RGPTT-SQ-R-R-RSHSRRS-G.GTASR	345
HPV49TSRGS-GSGGSVTTSRDSSPKRTARG--RGGSRRSPTPT-T-KHERRS---GGEPV-GG	372
GROUPI.con	???	130
BPV1	323
BPV2	324
EEPV	GGQ.....	331
DPV	GGL.....	332
COPV	287
CRPV	295
BPV4	Q.....	300

FIGURE 13L

- 34/43 -

GROUP A . con	PIVHLKGdaN?LKClRYRl.kkyk?.LY???SSTWbW	231
HPV31	---I---I---.S---Q---EQV---	328
HPV52	---I---P-S---V.-TH-S.-VQI---	323
HPV35	-----T---S---.G---A---QDA---R-	323
HPV35h	-----T---.G---A---QDA---R-	323
HPV16	-----T---F---HCT---TAV---	321
HPV33	-----ES-S-----P-E---SSM---	309
HPV58	-----P-S-----PF-D---CWM---	314
RbPV1	-----ES-C---F---G-H-H---INI---R-	324
GROUP B . con	PIVqlqGdsHcLKClRYRl?dkykh.LF?laseTWHW	289
HPV6b	---F-E-----N-RHR---D-I---	321
HPV11	-----N---E---	320
HPV13	-----HE---D---L---	330
PCPV1	-----R---H---M---	330
HPV34	---H-K-K-S---L---MHKG-S---NNVTI---	302
GROUP C . con	PIIHLKGdNcLKClRYRl.rKy?d.hy??ISaTWHW	278
HPV39	-----G---Q---DT.LFEN---C---	326
HPV18	-----R-----HS---RD---	322
HPV45	-----A---SE---	326
GROUP D . con	pvVHLKGe?HrLKClRYRl.qKhK?.LfvnsSTyHW	239
HPV51	FI---DT-C---F---T---G---YK---V---	317
HPV26	FI---DT-S-----K---G---YC---V---	332
HPV30	-----P---C---H---I---	333
HPV53	---I---A-----Q---T---	337
HPV56	-----P---C---Y-T---D-T---	327
GROUP F . con	PvIbL?GdaHcLKClRYRl??k????Ly???SaTWbW	190
HPV27	---R-----V.Q-HKDK---DRV---	343
HPV57	---Q-E-----V.Q-HKDV-FVKA---	338
HPV2a	---R-----V.Q-HKDV-ARV---	346
HPV3	---R-P-----N-GKNK-SRT---R-	338
HPV10	---R-P-S-----HHGKRX---SRS---R-	332
HPV7	---I-Q-E-----T-VSH---TNS-T---R-	330
HPV40	---I-Q-E-E-----G-VSH---FCNS-T---R-	325
HPV32	---Q-P---L-W---KKHCSH---FTQV---L	344
HPV42	---Q-P---L-F---KKHCSH---FTQV---L	348

FIGURE 13M

GROUPC.con	s??sp??vg??hr??v??glarl??l?aeArdpp?i?lKG?aNhLkClRYr?kms???.df???sTtw??	182
HPV1a	...-ARD-SI-TTPQKHS---RR-LQ--W---VVCV--G--Q-----L-A-TQV.--DSI----H-	354
HPV63	AFI--GD--TST-SPPKG-Q---RR-IQ-----I-C--GP-Q-----I-A-NSS.--ESI----H-	351
HPV41	-SDFTSGESDEGHR-RHRA-RKKTAGV-P-ECHYLGA--PV---R---KV--KYSG.-IMYLG--FT-	340
HPV4	-AP--AE--SR--Q-ERQ-----GL-Q-----M-L--T-----V---KV--NCC.N-LFM--V-N-	358
HPV65	-AP--GE--IR--T-ERQ-----GQ-Q-----M-L--T-----V---KQ--SHC.G-LFM--V-N-	358
GROUPH.con	rGvsp??VG?svrsvs?khtGRLgRLLeEA?DPPvilvrG?ahLkclRnRak?ky?g.Lf??ISTtwSV	311
HPV19	H---ADA-T--HT--GRN-----L-----EP--RS-----HM-R.--SS--A---	446
HPV25	H---ADA-T--HT--SR-----L-----D--RS-----HM-T.--SS--A---	455
HPV14d	--I--SD--K-LQ--SRN-----D--L-----DP--R-----Q-FT--YRA--A---	436
HPV5	-----GE--G-L--S-----R---I-K-A-----HV---I-M.--RS-----	467
HPV5b	-----GE--G-L--S-----R---I-K-A-----Y---I-T.--RS-----	467
HPV5d	-----GE--G-L--S-----R---I-K-A-----HV---I-M.--RS-----	467
HPV47	-----SE--KQL--GA--S-----R-----D-----RH--R.--RS--F---	459
HPV12	-----EQ--R-LQ--S--R-----L---ICK-G-----RH--T.--KA-----	447
HPV8	-----SE--R--Q--A-----D--I-----E-----RVR--R.--KY-----	451
HPV15	G--I--AD--S---LGR-----E-----R-----L--D--K---F--K--QD.-VKYY-----	409
HPV17	G--A--EQ--K---GRFPG--T-----R-----L--E--K---Y--KR-GS.-VKYY-----	405
HPV9	V---DE--TR---GAG-H---A---A--K---LM-L--D--V---Y-F-ERK-KR.-VKYY-----	414
HPV49	V--I--DK--SR-QT--GR-L-----S-----L--DP-I---Y-Y-D-KRKL.-VKHY-----	441

<- Début du domaine de dimérisation et de liaison
avec l'ADN C-terminal conservé de BPV1

fin de la région charnière interne pour BPV1 ->

GROUPI.con????????????????????????p?lllG??Rq?KCyrIR?k??hr?..?y???tTw??	152
BPV1GGSCFA-I-TA--V-----V-KH--H.R-ENC---FT	362
BPV2GGSCFA-I-SA--V-----V-KH--H.R-ENC---SFT	363
EEPV-C-I--HG--A-----C-RYF-E.H-QHI---WT	367
DPV-C--I--TG--V---S--V-RW--D.K-HHC---WA	368
COPVRLGRLLQEA YDP-V-V-A-DP-SL--I-Y-LSHK--G.L-LGAS--KV	335
CRPVRLRELITEASDP-VIC-K-GH--L--L-Y-L-SK-SS.LFDCIS--SW	343
BPV4VGGRSSTPKRQASSRLAQLIDAAYDP-V---Q-AA-TL--F-R-ATQA-PH.KFLCMS-S-TV	362

FIGURE 13N

début de E5 pour HPV31 ->

GROUP A. con	T??ctn?k??...?aIVTlTy?te?Qrd?FL?VKIPaFv?vetG?Msi	265
HPV31-DG-HK..N-----ISTS---D-H-----S---Y-T-	372
HPV52	-SHE---H-L....G---I---SD-T---QQ-K-----Q-IQ-V-L	368
HPV35-D-KQ..I-----T-Y---K-T-----T-I-Y---	367
HPV35b-D-KQ..I-----T-Y---K-T-----T-I-Y---	367
HPV16GH-V-HK..S-----DS-V---Q-SQ---K-IT---F---	365
HPV33	-SDK.K-S-....HG---V-FV---Q-QOM-G---P-QI---F-TL	353
HPV58	-SDD.KGD-V....G---V-T-T---QL-H---P-QI---V-L	358
RhPV1	ANHASEK.....-V-FAN-L---QQ-H---S-TL-Q-V-TV	366
GROUP B. con	?spnaphkh??...aivTltysseeQrqqFL??vKIPPTlabbkIGMSlhlL	333
HPV6b	A-SX-----V-D-----DV-----	368
HPV11	A-E---F.....-NS-----R-V-----	367
HPV13	TA--NSQ-----L-----VR-Q---D-KT-----T-----Q--	377
PCPV1	TASSNST-H.....-VR-Q---D-KT---A-K-T---FQ--	377
HPV34	T.N-..TNSKC...GVI-FMF---TS-QK---QCA-----VSS-Y-I	345
GROUP C. con	?tG?gnknt.....GILTVTY?eE?QR?kFLdtV?IP?SVqisvGYMT?	314
HPV39	IR-K-T-A.....-AT-S---Q-----K-S-HV-L---L	370
HPV18	..A--EX-----H-T-T---E-A-D---L---M	365
HPV45	..C-----H-V---HT---V-T-H-----I	368
GROUP D. con	?t????????...siliTivykdetQR??Fl??vKiPps??lvlg?MtlVDM	271
HPV51	..SHTKT.....G-V---FDSAR---ET-IKTl-V---VT-S-I---	358
HPV26	..SNDTNDQ....G-V---TFMSI---NH-TT---Q-ITST---I-S-	375
HPV30	TNTHTEY.....-Y-V-----AN-NV---IKI-M-B-G---	378
HPV53	..NVNCAVNM....-Y-V-----QK-DI---VS---H-C---	384
HPV56	TSTDHKNY.....-I-----NS-SH---VVYR---VDK	367
GROUP F. con	????????????...a?vTlwY?e?QR??FL??vKiPhgik???Gym?fvF?	216
HPV27	AGGKCDKT.....-F-V---I-VE---KE---TR-H---VIALP---A--	388
HPV57	ACGNCDKT.....-F-----K-QE---AE---TR-HL---V-ALP---A--	383
HPV2a	AGGNCDKT.....-F-----T-VE---TE---TR-S---LIALP---A--	391
HPV3	SCESENQC.....-Y-I---T-YG---EA---ST---V-P---QVIL-H-M-T	383
HPV10	SCESENQA.....-F-----T-DT---TE---NV---V-P---QVIL---I-	376
HPV7	TTESRTNKA.....-II---T-S-VH---SQ---AL---T---HSL-MLTLM	375
HPV40	TTESRTEKN.....-II---T-S-VQ---SD---AI---T---HSL-MLTLM	370
HPV32	TEKDYTRDSKD...GII-IH-YNEE---DK---ST---L-P---SCI---MLQ-M	394
HPV42	TENDCTRDTKT...GII-IH-YDEA---NL---HT---S---SCI---MLQ-I	398

FIGURE 13 O

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

- 37/43 -

début de E5 pour HPV41 ->		
GROUPG.con	v??d?ter?g?...?Rml?af?s??qRd?Flk?v??Pk?????g??n?l	206
HPV1a	TDRKN---I-S...A---VK-IDEA---EK---ER-AL-RSVSVFL-QF-GS	401
HPV63	-HNKC-D-V-H...A---VR-I-TE---R---DK-VV---SVSVIL-AFDGS	398
HPV41	TES-G---C-S...G-FFC---SHETK-EK---S-KI---HIGLFRAHAEK-	387
HPV4	-.G-CSHHH.....S---I--D-TD---A-V-HNLF--LCTTTY-SL-S-	402
HPV65	-.G-VS-NH.....S---I--K-PG---S-V-HNLF--LCTTTY-SL-S-	402
GROUPH.con	Vagdg?eRlGR...aRmlisF?s??qR?dfd??vkyPkgVd?s?GnlDaL	349
HPV19	-----I-----...T-----V-FH---KH---DT-R-----R-F-SF---	493
HPV25	-----I-----...-----I-NS---KH---DA-R-----R-F-SF---	502
HPV14d	-----T-----...-----F-FH---R---QT-----R-F-SF---	483
HPV5	-----T-----...P-----S-YT---R---EA-R-----KAY-----	514
HPV5b	-----T-----...P-----S-YS---R---EA-R-----KAY-----	514
HPV5d	-----T-----...P-----S-YT---R---EA-R-----KAY-----	514
HPV47	-----SI-----...-----SCLT---R---DA-----EW-Y-S---	506
HPV12	-----ST-----...P-----T-TN---K---ET-----ETAY-----	494
HPV8	-----ST-----...-----L-T-AG---K---ET-----T-Y-----	498
HPV15	-G-TSND-I---...-L-LA-S-NTE-EL-IXIM-L-P---V-L-Y--D-	456
HPV17	-GANTRD-I---...-LA-WTYDE-EL-IDXM-L-P---V-L-H--D-	452
HPV9	-GE-SCD-V---...A--ILA-DTYEH-QQ-IRTM-L-PT--V-L--V-D-	461
HPV49	-GV--N--I---...-L--T-NST-SQYVKIM-L---EV-F--F-K-	488

début de E5 pour CRPV ->

Fin du domaine de dimérisation et de liaison avec l'ADN pour BPVI ->

GROUPI.con	v???g?er?g????a??litF????QR??F1??VpLPpg????t???dF	176
BPV1	-ADN-A--Q-Q...-QI---GSPS--QD--KH-----NISGF-ASL---	410
BPV2	-ADN-A--Q-Q...-QI---GSPG--QD--KH-----NISGF-ASL---	411
EEPV	-GER-S--H-D...-CV-V--KDSS--GV--KR-----RAQAL-MIA---	415
DPV	-GEQ-S--P-D...-TVIV--KDQS--SM--QQ-----SANGV-MTV---	416
COPV	TSGGDGASKHDRGS-RK-LA-LSDQ--ED-MDR-TF-KSVRVFRGGLDEL	385
CRPV	-DTTSTC-L...GSGRM--K-ADSE--DK--SR-----STTQVFLGNFTGL	390
BPV4	-SKTSPLKS-....RRM--A-SKSE--NC--AS-R--K-VSAVKGALDGL	408

FIGURE 13P

GROUP A. con	ATGATGGAGac?cTttc?caaCGTTTAAaTGTgtgtCAGGAcAAAAATacTAgacat	55
HPV31	-----T-----T-----T-----	54
HPV52	-----T-GA-AC-GGC-----CAGTG-----A-----T-TA	54
HPV35	-----G-----C-G-----G-----	57
HPV35b	-----G-----C-G-----G-----	57
HPV16	-----T-----GC-----AC-----	54
HPV33	-----GAAA-A-AGC-----CAGTG-----G-----T-T-	54
HPV58	-----GAAA-A-AGC-----G-CAGTG-----C-----CATA	54
RbPV1	-----AG-A-G-AG-G-----G-C-TG-----G-CT-----TG	57
GROUP B. con	ATGATGGA??CAaTagcCAAgCgTTTAgATGCGTGcCAGGAacagtTgtTAGAACT?	54
HPV6b	-----AG-----T-----	54
HPV11	-----AG-----T-----T-----	54
HPV13	-----GA-----A-----G-----	54
PCPV1	-----GA-C-----A-----G-----	54
HPV34	-----GA-C-GTG--A-----AG-----T-----CGCAA-CC-----G	57
GROUP C. con	ATGA?GAtGcAGACaccGaaGgAAaCcCTTTCggAACGTTTAAgTGcGTTaCAGGACAAAAATacTAGAccAC	71
HPV39	-T--A-G-----AT--T-A-----A-----AC-----A--T-----AT--	69
HPV18	-----G-----CA-----	66
HPV45	-----A-----T-----	72
GROUP D. con	ATGGAGAc?CTaTgCCaACGTTTAAaATGcGTGCCAGgAgAAAAATaCTAGACTgT	53
HPV51	-----C-----C-----T-----	54
HPV26	-----AC--T-----G-----A-----	54
HPV30	-----T-----G-----T-----	54
HPV53	-----G-----G-----T-----	54
HPV56	-----G--T-C-----A-C-----	54
GROUP F. con	ATGGAAaAcACTaGCgAacCGttTAGATgCGTGCCAGGA?aagtTgcTAGAACTg	53
HPV27	-----G-C-----T-----	54
HPV57	-----G-----G-----G-C-----	54
HPV2a	-----G-----G-C-----	54
HPV3	-----T-----C-AA-A-----	54
HPV10	-----C-----C-AA-----A	54
HPV7	-----G-A-----C-GG-CC-----TT-----AC-----T-----T	54
HPV40	-----G-AT-----C-GG-CC-----TT-----AC-----T-----	54
HPV32	-----G-----G-C-A-----AC-----T-----	54
HPV42	-----G-C-----G-C-A-----AC-----T-----	54

FIGURE 13Q

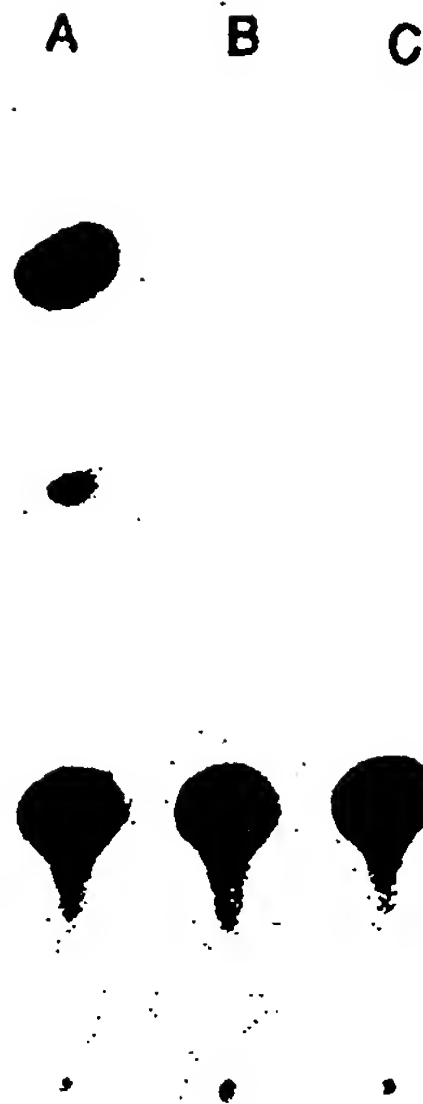


FIGURE 14A

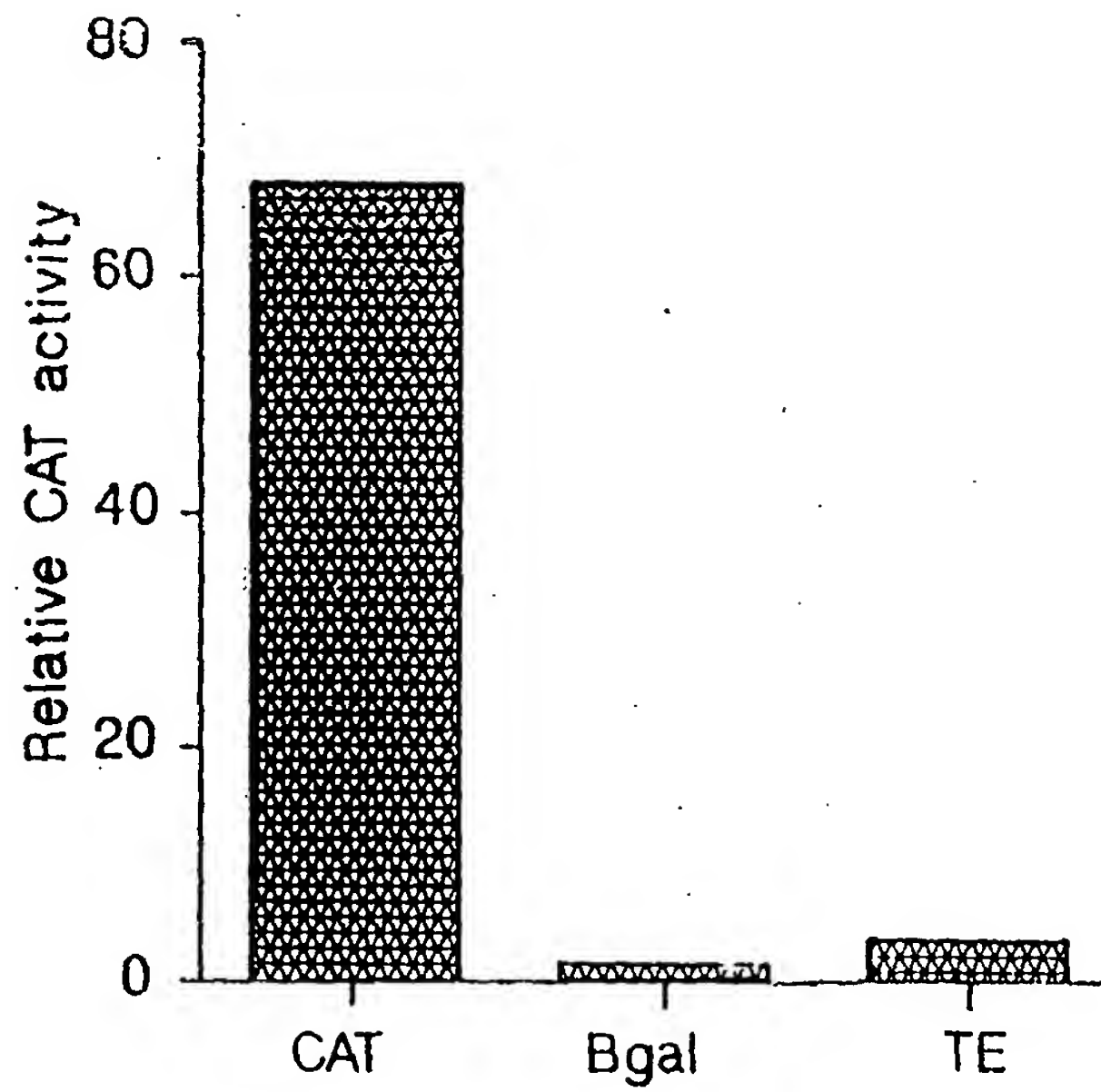


FIGURE 14B



FIGURE 15A



FIGURE 15B

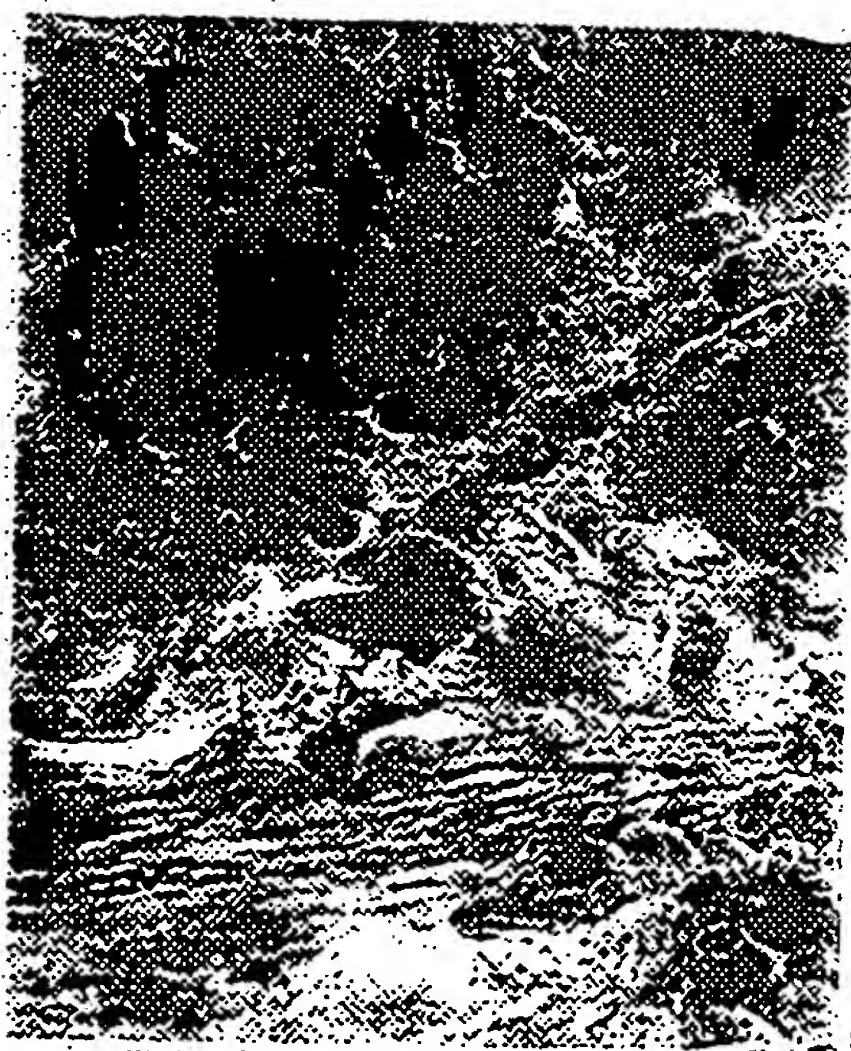


FIGURE 15C



FIGURE 15D

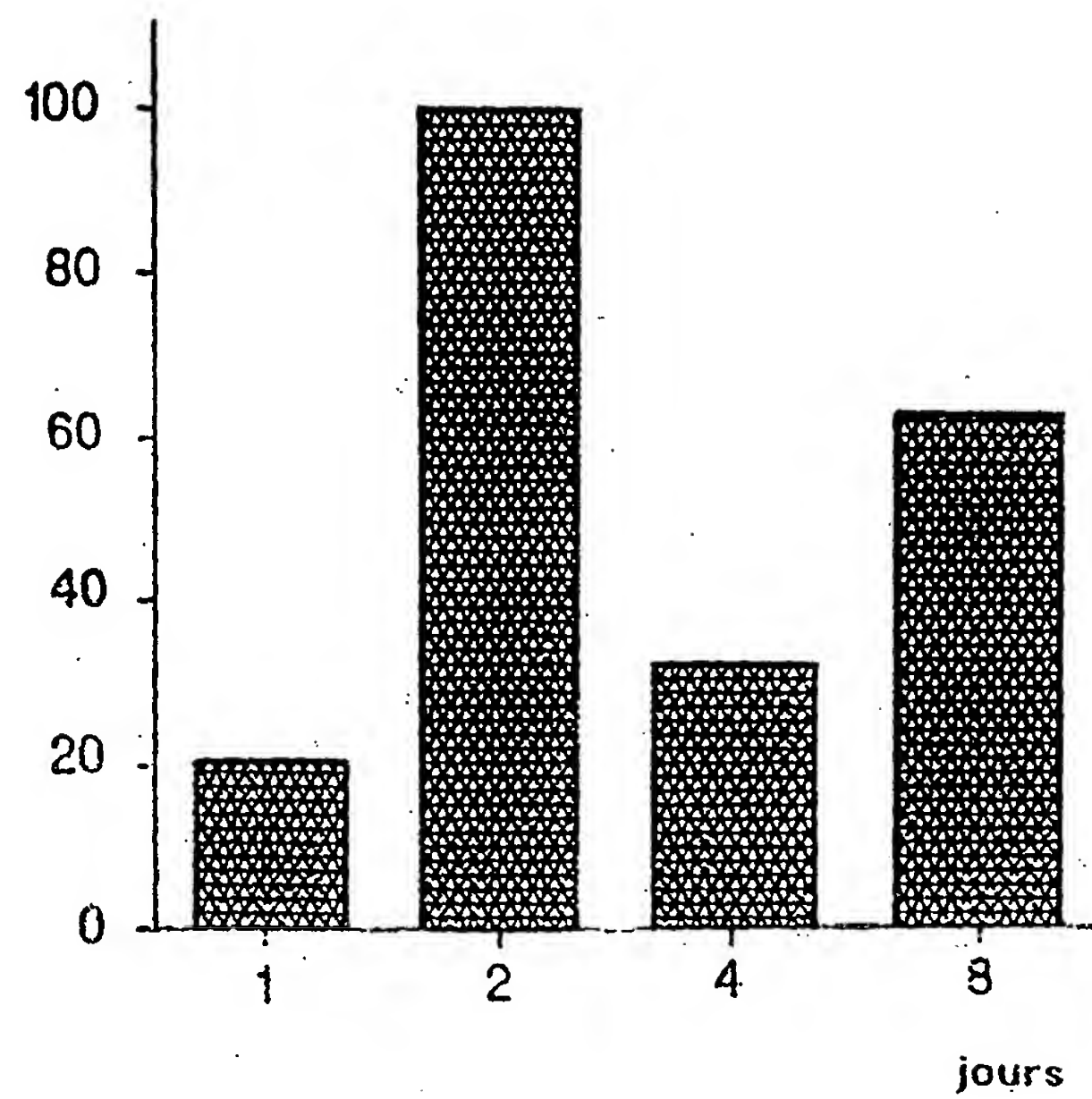


FIGURE 16

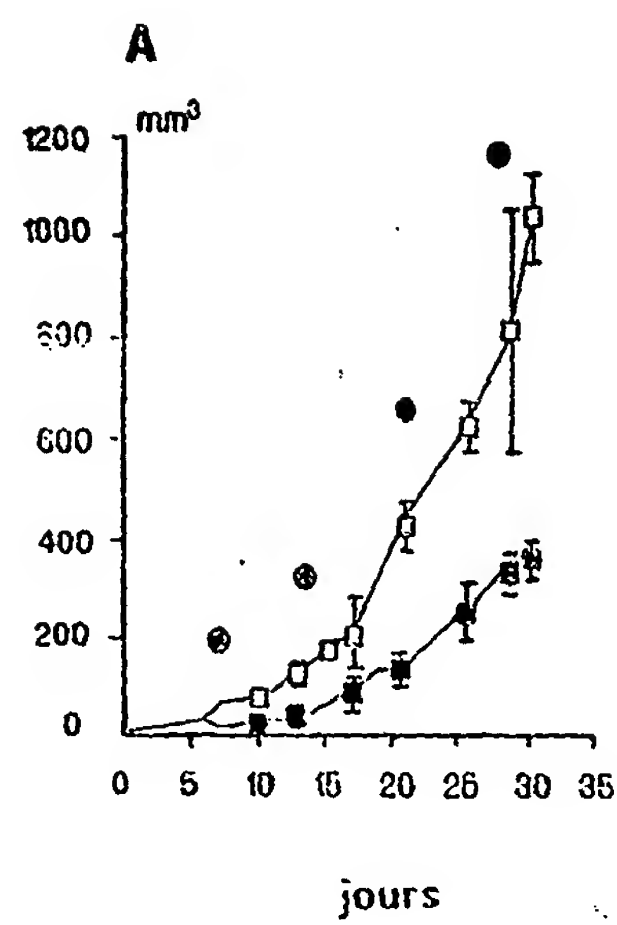


FIGURE 17A

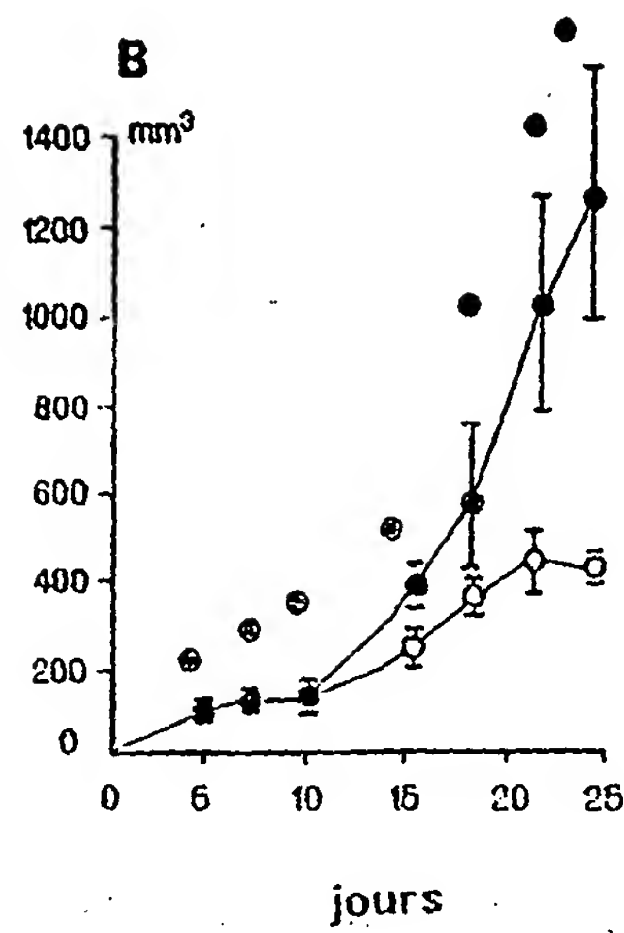


FIGURE 17B

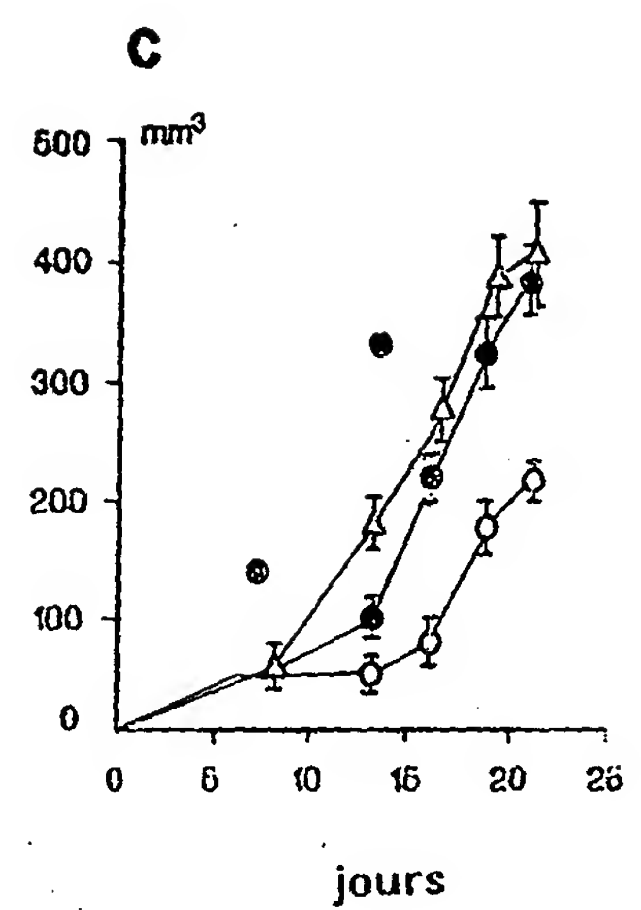


FIGURE 17C

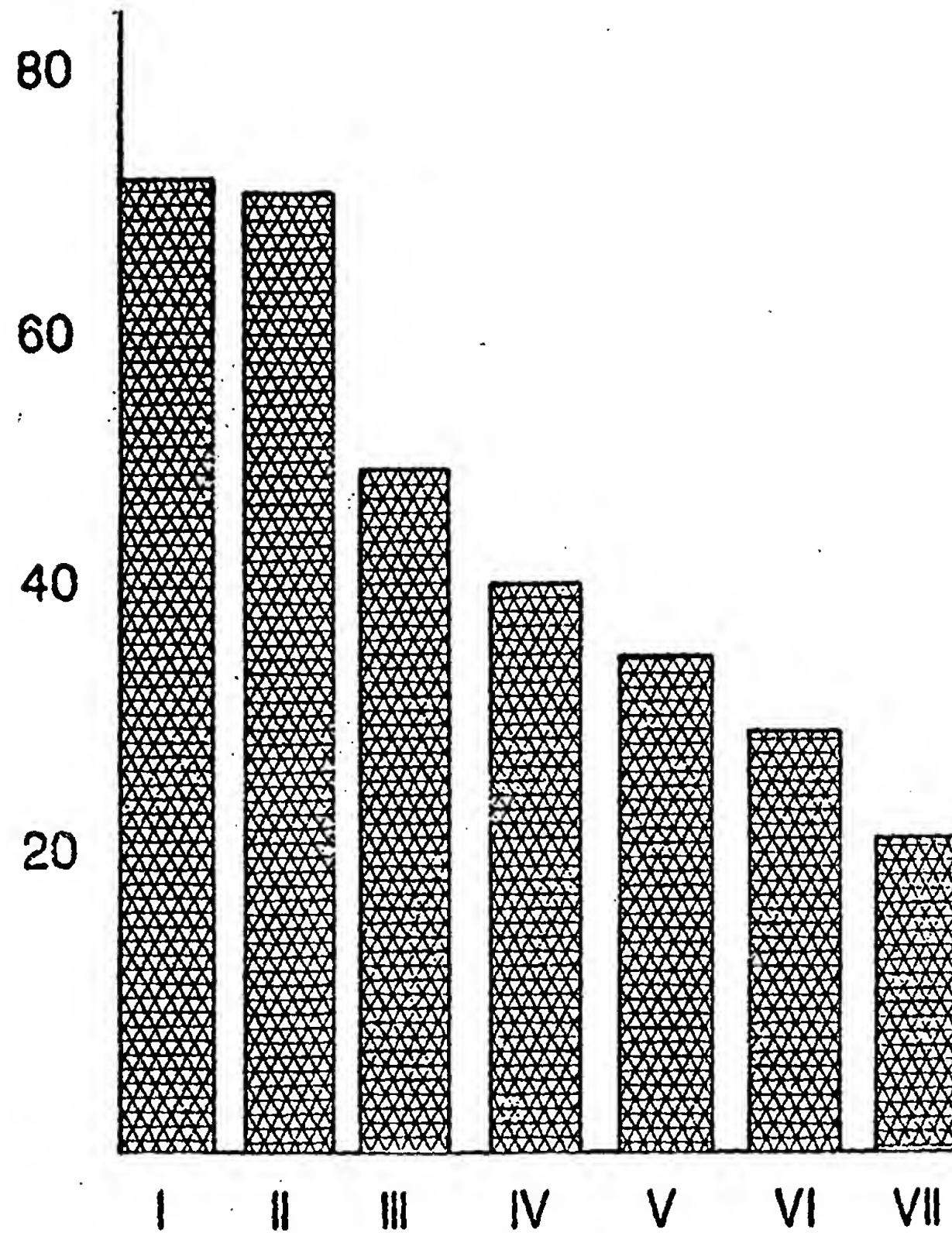


FIGURE 18

SEMI-LE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/37 C07K14/025 A61K39/12 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 41018 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 December 1996 see page 37, line 6 - page 42 ---	1,5, 16-23
X	J. HAM ET AL.: "The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES., vol. 16, no. 11, November 1991, CAMBRIDGE EN, pages 440-444, XP002042972 cited in the application see figure 2 --- -/--	1,4-6,15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 June 1998

Date of mailing of the international search report

12/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. BROKAW ET AL.: "Amino acids critical for the functions of bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 1, January 1996, pages 23-29, XP002042973 cited in the application see the whole document	1-4,6
X	C. DEMERET ET AL.: "Control of HPV18 DNA replication by cellular and viral transcription factors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 23, 1995, OXFORD GB, pages 4777-4784, XP002042974 cited in the application see page 4779, right-hand column, paragraph 1	1,5
X	M. FERGUSON ET M. BOTCHAN: "Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: Its role in transcription and replication" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 7, July 1996, pages 4193-4199, XP002042975 cited in the application see the whole document	1,6
X	WO 91 08313 A (ISIS PHARMACEUTICALS) 13 June 1991 see example 1	1,5,6
P,X	C. DESAINTE ET AL.: "Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis" EMBO JOURNAL, vol. 16, no. 3, 3 February 1997, EYNSHAM, OXFORD GB, pages 504-514, XP002042976 see the whole document	1-31

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9641018 A	19-12-1996	AU 5875396 A EP 0836652 A	30-12-1996 22-04-1998
WO 9108313 A	13-06-1991	AT 163973 T AU 650257 B AU 7175691 A CA 2070664 A DE 69032134 D EP 0503002 A FI 922593 A KR 9612069 B US 5665580 A US 5681944 A US 5457189 A	15-03-1998 16-06-1994 26-06-1991 05-06-1991 16-04-1998 16-09-1992 04-06-1992 12-09-1996 09-09-1997 28-10-1997 10-10-1995

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/37 C07K14/025 A61K39/12 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 41018 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 décembre 1996 voir page 37, ligne 6 - page 42	1,5, 16-23
X	J. HAM ET AL.: "The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES., vol. 16, no. 11, novembre 1991, CAMBRIDGE EN, pages 440-444, XP002042972 cité dans la demande voir figure 2	1,4-6,15

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 juin 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/06/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cupido, M

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. BROKAW ET AL.: "Amino acids critical for the functions of bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 1, janvier 1996, pages 23-29, XP002042973 cité dans la demande voir le document en entier	1-4,6
X	C. DEMERET ET AL.: "Control of HPV18 DNA replication by cellular and viral transcription factors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 23, 1995, OXFORD GB, pages 4777-4784, XP002042974 cité dans la demande voir page 4779, colonne de droite, alinéa 1	1,5
X	M. FERGUSON ET M. BOTCHAN: "Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: Its role in transcription and replication" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 7, juillet 1996, pages 4193-4199, XP002042975 cité dans la demande voir le document en entier	1,6
X	WO 91 08313 A (ISIS PHARMACEUTICALS) 13 juin 1991 voir exemple 1	1,5,6
P,X	C. DESAINTE ET AL.: "Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis" EMBO JOURNAL, vol. 16, no. 3, 3 février 1997, EYNSHAM, OXFORD GB, pages 504-514, XP002042976 voir le document en entier	1-31

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9641018	A	19-12-1996	AU 5875396 A	30-12-1996
			EP 0836652 A	22-04-1998
WO 9108313	A	13-06-1991	AT 163973 T	15-03-1998
			AU 650257 B	16-06-1994
			AU 7175691 A	26-06-1991
			CA 2070664 A	05-06-1991
			DE 69032134 D	16-04-1998
			EP 0503002 A	16-09-1992
			FI 922593 A	04-06-1992
			KR 9612069 B	12-09-1996
			US 5665580 A	09-09-1997
			US 5681944 A	28-10-1997
			US 5457189 A	10-10-1995